

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Importância de *Campylobacter* spp. e *Helicobacter pullorum* na  
produção avícola como agentes zoonóticos**

Micael Dias da Costa

Orientador:

**Prof. Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa (ICBAS-UP)**

Co-Orientadores:

**Doutora Mónica Oleastro (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge)**

**Engenheira Susana Cardão**

Porto 2018

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Importância de *Campylobacter* spp. e *Helicobacter pullorum* na  
produção avícola como agentes zoonóticos**

Micael Dias da Costa

Orientador:

**Prof. Doutor Paulo Manuel Rodrigues Martins da Costa (ICBAS-UP)**

Co-Orientadores:

**Doutora Mónica Oleastro (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge)**

**Engenheira Susana Cardão**

Porto 2018

## Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos às instituições que abertamente me receberam e permitiram a realização de este trabalho, nomeadamente a empresa avícola e respetivo matadouro, o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge e o Laboratório de Microbiologia e Tecnologia Alimentar do ICBAS. Sem a colaboração destas três instituições seria impossível a realização de qualquer trabalho.

Ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Costa, por ter cepticamente referido este assunto como possível proposta de trabalho de estágio e, posteriormente, com toda a sua exigência ter crescentemente depositado a total confiança em mim, tendo sempre apoiado e esclarecido qualquer dúvida existente no decorrer do trabalho, sem nunca dizer não às diversas propostas e hipótese apresentadas por mim.

À Doutora Mónica Oleastro, que tão bem me recebeu, por todo o seu imenso apoio científico e conhecimento transmitido, com a sua sempre e pronta disponibilidade e entusiasmo, tal como o seu infindo apoio na elaboração do relatório final.

À Engenheira Susana Cardão, tal como a Engenheira Carla e Dr. José Vieira, por todo o apoio na agilização do processo de recolha de dados das explorações amostradas.

À toda a equipa do Microlab (à Patrícia, à Joana e à Sónia), por toda a disponibilidade no acompanhamento e esclarecimento de dúvidas na realização dos procedimentos, mesmo quando ocupava espaço e material em demasia. Um especial obrigado à minha grande mestre Nanci que me introduziu ao laboratório e às técnicas e procedimentos que, com muita paciência e disponibilidade, me orientou constantemente ao longo de todo o processo: a ela um eterno obrigado por tudo! Não podendo obviamente faltar, um grande e especial obrigado à D. Elisabete, que com o seu jeito gentil, me ajudou e explicou a realização das diversas tarefas essenciais num laboratório. Um grande obrigado para esta grande equipa que tão bem me recebeu, ao bom ambiente de trabalho e aos bons momentos passados!

À equipa do INSA que sempre se disponibilizaram a explicar os seus procedimentos e trabalhos diários, e principalmente à Joana, que prontamente me ajudou e esclareceu nos procedimentos mais genéticos.

À toda a equipa de inspeção, principalmente à Dra. Catarina, Dra. Inês e Eng. Fátima, por toda a disponibilidade, colaboração e interesse demonstrado pelo trabalho.

Ao laboratório de Histologia, principalmente aos Professores Ricardo e Marta, pela sua colaboração neste estudo, também eles com total disponibilidade e gentileza em me integrar nos processos e visualização das lâminas.

Ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, que gentilmente emprestou material imprescindível para realização dos procedimentos laboratoriais.

Aos meus amigos próximos João, André, Ju, Ana, Ricardo e especialmente ao Ismael, que me apoiaram e sempre se disponibilizaram para me ajudar.

Por fim, aos meus familiares, principalmente os meus pais, à minha irmã, ao Rafael e meus tios Firmino e Etelvina, por todo o acompanhamento, apoio e preocupação ao longo de todos estes anos. Obviamente, à minha avó, que certamente estará muito contente e orgulhosa por este momento.

## ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular que serviu de base para esta dissertação de mestrado foi realizado na área de inspeção sanitária, microbiologia e investigação. Teve a duração total de seis meses, tendo sido realizadas atividades distintas em três locais diferentes:

- Unidade de abate de frangos, com sala de desmancha, transformação e embalagem associadas na zona centro do país:  
Inicialmente, realizei um período de um mês no acompanhamento do Médico Veterinário Oficial nos exames *ante e post mortem* e no processo de abate e desmancha. Este período teve como objetivo a correta integração no matadouro e reconhecer as principais patologias das aves, diferenciando-as das tecnopatias. Neste período, o foco principal foi dado à avaliação e caracterização do pacote visceral após o processo de evisceração.  
Concluído esse período, foram realizadas um total de 11 visitas ocasionais para recolha de amostras para estudo (dias 21 de agosto, 18 e 25 de setembro, 23 e 30 de outubro, 3, 15 e 29 de novembro e 5, 21 e 26 de dezembro, 2017). Juntamente com as recolhas das amostras (fígados e cecos), foi realizado um registo fotográfico e recolha de toda a informação dos produtores correspondentes.
- Laboratório de Microbiologia e Tecnologia Alimentar do Departamento de Produção Aquática do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto:  
Esta etapa, com duração de três meses e meio, teve como objetivo o isolamento e identificação dos microrganismos das amostras recolhidas previamente no matadouro. Baseou-se na cultura microbiológica, com identificação fenotípica e genotípica (por PCR) dos isolados, tal como uma caracterização morfológica das colónias. Durante este período, também pude acompanhar e realizar algum do trabalho diário do laboratório com amostras clínicas para identificação dos agentes, como também a realização de trabalho mais “técnico” de preparação de meios. De realçar que, durante o estágio, realizou-se um estudo introdutório de caracterização de hepatites distintas recolhidas no matadouro (33 amostras), que não constam desta dissertação. Para o presente trabalho foram consideradas apenas 36 amostras recolhidas (26 cecos, 9 fígados e 1 baço), tendo as 19 amostras de ceco anteriores sido usadas para o processo de otimização do protocolo.
- Laboratório Nacional de Referência das Infecções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infeciosas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em Lisboa:  
Com a duração de um mês e meio, foi dedicado à avaliação de resistências a agentes antimicrobianos de 147 isolados de *Campylobacter* spp. e *Helicobacter pullorum* previamente conseguidos. Foi também realizada a caracterização genotípica de *Campylobacter* com base na diversidade do gene codificante da Flagelina A, bem como a

deteção de um marcador de virulência, sistema secretor de tipo VI (T6SS) em *H. pullorum*. Também neste período pude observar a realização dos procedimentos diários do laboratório com outras bactérias entéricas.

- Explorações avícolas:

Numa etapa final, nas amostras com resultados mais divergentes, foram realizadas visitas às explorações e discussão com os técnicos respetivos para uma melhor caracterização das explorações.

## Resumo

As diarreias infecciosas são a maior causa de morbidade e mortalidade do mundo. Nos últimos anos, *Campylobacter* spp. tornou-se a bactéria patogénica transmissível por alimentos mais importante do mundo, sendo desde 2005, a toxinfecção alimentar mais frequentemente notificada na Europa; *Helicobacter pullorum* tem sido detetada em estudos mais recentes.

Estes organismos são muito adaptáveis e têm-se vindo a tornar extremamente resistentes a vários antibióticos. Tanto o *Center for Disease Control and Prevention* como a *World Health Organization* listaram recentemente *Campylobacter* spp. como uma ameaça séria de resistência a antibióticos. Estas bactérias multiresistentes reduzem a eficácia de tratamentos e provocam um aumento de morbidade e mortalidade na produção avícola e nos humanos. A infeção com estes organismos é um dos maiores desafios em saúde pública.

A carne de frango é procurada como a maior fonte de proteína em todo o mundo. Devido ao risco zoonótico da presença na carne de frango juntamente com o risco de transmitir organismos multiresistentes, *Campylobacter* spp. e *H. pullorum* deverão ser considerados agentes patogénicos emergentes que necessitam de ser estudados mais aprofundadamente. Estima-se que a avicultura, incluindo a transmissão ambiental e o contacto animal direto com preparação e consumo de carne de aves, é responsável por cerca de 80% das infeções por *Campylobacter* em humanos.

Neste trabalho está apresentado uma breve revisão sobre as espécies referidas, um estudo de frequência da presença destes organismos na produção avícola, e a sua caracterização quer no tocante ao fenótipo de resistência, quer na componente genotípica. No universo das explorações amostradas, obteve-se uma frequência de 78% de *Campylobacter* spp. e 72% de *H. pullorum*. Todos os isolados estudados foram resistentes à ciprofloxacina e 91% e 73% de *C. coli* e *C. jejuni*, respetivamente, foram considerados multiresistentes. Sublinha-se a identificação de isolados resistentes ao ertapenemo, nunca descrita até ao momento, bem como a relação genética entre estes isolados.

## Índice de Abreviaturas

%	percentagem
AME	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
APT	Buffered Peptone Water (Água peptonada tamponada)
BE	Bomba de efluxo
CC	complexo clonal
CDC	<i>Center for disease control and Prevention</i> (Centro para o controlo e prevenção de doenças)
CDT	Toxina bacteriana de distensão citoletal
CdtB	<i>Cytolethal distending toxin B</i> (Sub-unidade B da toxina de distensão citoletal)
CFA	<i>CampyFood Agar</i>
CLO	<i>Campylobacter-like organisms</i> (organismos tipo <i>Campylobacter</i> )
COS	<i>Columbia agar</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> (Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças)
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)
HE	Hematoxilina-eosina
HEH	Espécies <i>Helicobacter</i> enterohepáticas
IgY	Imunoglobulinas tipo Y
IL	Interleucina
LPS	lipopolissacáridos
MDR	<i>Multidrug-resistant</i> (Multirresistentes a antibióticos)
MDRGI	<i>Multidrug-resistant genomic island</i> (Ilhas genómicas de multirresistências)
CMI	Concentração mínima inibitória
NF- κB	Fator nuclear-kappa B
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RND	<i>Resistance-Nodulation-Division</i> (Divisão de nodulação de resistência)
SNPs	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleótido único)
ST	<i>Sequence Type</i>
T3SS	Sistema de secreção de proteínas do tipo III
T6SS	Sistema de secreção de proteínas do tipo VI
TE	Tris-EDTA



TSA	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
UFC	unidades formadoras de colónias
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> (Sequenciação do genoma total)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

## ÍNDICE

I.	Introdução .....	1
II.	Revisão bibliográfica.....	2
1.	Campylobacter spp.....	2
	Epidemiologia .....	2
	Prevenção e Controlo .....	4
	Resistência a antimicrobianos .....	7
	Mecanismos de Resistência Antimicrobiana .....	9
2.	Helicobacter pullorum .....	12
	Prevalência .....	12
	Patogenicidade e Virulência .....	14
	Resistência a antimicrobianos .....	17
III.	Objetivos do estudo .....	19
IV.	Métodos e Materiais .....	19
1.	Seleção das amostras .....	19
2.	Cultura e isolamento .....	19
3.	Análise Histopatológica .....	20
4.	Identificação fenotípica e testes bioquímicos.....	21
5.	Identificação por PCR .....	21
6.	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	22
7.	Whole Genome Sequencing (WGS).....	23
V.	Resultados .....	23
1.	Cultura e Isolamento .....	23
2.	Caraterização das explorações .....	24
3.	Prevalência nas explorações .....	24
4.	Relação entre a prevalência e os parâmetros das explorações .....	25
5.	Análise Histopatológica .....	25
6.	Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos.....	27
7.	Genótipo flaA.....	28
8.	T6SS em H. pullorum .....	28
9.	WGS .....	30
VI.	Discussão .....	31

## I. INTRODUÇÃO

A carne de frango é a maior fonte de proteína à escala global. Dada esta crescente procura, os produtores avícolas tentam qualquer característica para aumentar o número, o peso e a eficiência alimentar, ao mesmo tempo que procuram reduzir o tempo para a sua criação. Investigações epidemiológicas sugerem que a maioria das infeções bacterianas transmitidas por alimentos são provocadas por agentes entéricos provenientes de animais (1, 2). Devido ao risco zoonótico da sua presença na carne de frango juntamente com o risco de transmitir organismos multirresistentes (MDR), *Campylobacter* spp. e *Helicobacter pullorum* deverão ser consideradas agentes patogénicos emergentes que necessitam de estudos mais aprofundados, nomeadamente a nível genómico para elucidar o seu potencial zoonótico (3-6). Tanto o *Center for disease control and Prevention* (CDC) como a *World Health Organization* (WHO) listaram recentemente *Campylobacter* spp. como uma ameaça séria de resistência a antibióticos (13).

As diarreias infecciosas são a maior causa de morbilidade e mortalidade do mundo, principalmente nas crianças (7). As bactérias mais frequentes são *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* tal como *Helicobacter* spp., sendo a espécie *H. pullorum* detetada em estudos mais recentes (8, 9). Nos últimos anos, *Campylobacter* spp. tornou-se o patogénico transmissível por alimentos mais importante do mundo, em virtude de, desde 2005, ser a infeção transmissível por alimentos mais frequentemente notificada na Europa e a segunda nos EUA (10).

As doenças infecciosas apresentam números muito elevados e o uso irracional e inapropriado dos antimicrobianos no seu tratamento e prevenção tem estimulado a emergência de bactérias MDR. A prevalência de organismos MDR na produção animal, e seus produtos, é geralmente associada ao uso desproporcional de antimicrobianos na prática Médico-Veterinária e profilaxia (11). Estas bactérias MDR reduzem a eficácia de tratamentos e provocam um aumento de morbilidade e mortalidade nas espécies pecuárias e nos humanos. O problema da resistência antimicrobiana é mais complexo nos países em desenvolvimento devido à alta densidade populacional, reduzidas condições sanitárias e menor política de controlo no uso de antimicrobianos. Para piorar o cenário, não são esperados novos agentes antimicrobianos nos próximos anos (12). O problema dos organismos MDR é um dos maiores desafios da saúde pública. As bactérias MDR, e os seus genes associados, podem-se disseminar entre as populações humanas e animais ou ser transferidos de modo horizontal, respetivamente. Sendo um problema crescente, é imperativo caracterizar a epidemiologia molecular dos organismos MDR para se perceber os modos de transmissão animal-homem.

*Campylobacter jejuni* é a espécie que mais frequentemente causa infeções nos humanos (≈ 90% das toxinfecções bacterianas), mas os maiores problemas de resistência a antibióticos estão descritos em *Campylobacter coli*, a segunda espécie mais frequente (13). Estima-se que a avicultura,

incluindo a transmissão ambiental e o contacto animal direto com a preparação e o consumo de carne de aves, está na origem de cerca de 80% das infeções por *Campylobacter* em humanos (14-16). *C. coli* foi anteriormente mais associado com os suínos em muitos países da UE. Contudo, atualmente, *C. coli* é tão ou mais prevalente que *C. jejuni* na avicultura (17-20). Na Ásia, o complexo ST (*sequence type*) -21 é o mais prevalente em isolados humanos e em frangos (21, 22) e os níveis de resistência aos diferentes antibióticos são indistintos entre *C. jejuni* de origem humana e aviária.

Para além das aves de consumo, estudos baseados na caracterização dos lipo-oligosacáridos, sugerem outras fontes de *Campylobacter* como as aves selvagens, animais de companhia, água ambiental (23) e bovinos (24, 25).

Muito recentemente, desde 1 de janeiro de 2018, sob exigência do Regulamento 2017/1495 da Comissão da União Europeia, *Campylobacter* spp. é incluído no controlo dos critérios microbiológicas como critério de higiene dos processos de abate.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. *Campylobacter* spp.

*Campylobacter* spp. pertence à família das *Campylobacteriaceae* que inclui três gêneros distintos: *Campylobacter*, *Arcobacter* e *Helicobacter* (26). *C. jejuni* e *C. coli* são as espécies mais conhecidas por serem as responsáveis por mais gastroenterites em humanos. Todas as espécies colonizam diferentes sistemas em animais domésticos e selvagens e podem ser encontrados em diferentes alimentos de origem animal (27).

Trata-se de uma bactéria de Gram-negativo, não formadora de esporos, com dimensões variáveis entre 0,5 a 5 µm de comprimento e 0,2 a 0,9 µm de largura. A maioria é móvel e apresenta movimento espiral causado por flagelo polar presente numa ou nas duas terminações da bactéria. É uma bactéria micro-aerofílica, produtora de oxidase, que cresce a temperaturas entre 37° e 42° C (26, 28).

## Epidemiologia

*Campylobacter* spp. é um microrganismo comensal do trato gastrointestinal de muitos animais selvagens (patos e gaivotas), animais de produção (aves, suínos e bovinos) e animais de companhia (cães e gatos), sendo responsável por zoonoses (29-31). A transmissão ocorre por contaminação fecal-oral na ingestão de comida ou água contaminada (32-34). O maior nicho ambiental é o trato gastrointestinal de aves, principalmente na avicultura (*broilers*, galinhas poedeiras, perus, patos e avestruz) que é reconhecida como a principal fonte de transmissão para o homem (35-39). O consumo desta carne representa 50 a 70% de casos de *campilobacteriose* nos humanos (40). Ingerir ou manipular carne crua ou mal cozinhada de frango é a principal causa para aquisição desta infeção (34, 38, 39, 41). É estimado que 60 a 80% da carne de frango no supermercado esteja contaminada com *C. jejuni* (42). A transmissão pode também ser feita por consumo de leite cru, carne vermelha,

frutas e vegetais não cozinhados (43, 44). A disseminação também pode ocorrer através de fezes de aves selvagens, sendo os parques de recreio de crianças juntamente com a presença de cães e gatos, potenciais fontes de infecção, (45-47). Considera-se que 500 a 800 Unidades formadores de colônias (UFC) são suficientes para iniciarem a colonização do trato intestinal inferior do homem (48, 49).

Na Europa, todos os dados relativos à epidemiologia de doenças transmitidas por alimentos são publicados periodicamente pela *European Food Safety Authority* (EFSA). Desde 2005, a campilobacteriose é a doença infecciosa transmitida por alimentos mais frequentemente reportada, com 246 307 casos reportados em 2016. Destes, em sensivelmente metade foram identificadas as espécies, sendo 99,7% identificadas como *C. coli* (9,3%) e *C. jejuni* (90,7%) (13). Contudo, acredita-se que o número atual de casos é de cerca de 9 milhões por ano (50-52). De acordo com a EFSA, infecção por *Campylobacter* causa custos de aproximadamente 2,4 bilhões de euros por ano para os sistemas de saúde. Apesar de ser a mais reportada, não é tão mediática por não causar surtos como *Salmonella* spp., ou, pelo menos, por não causar surtos conhecidos. Considerando o número elevado de casos, a fatalidade é baixa (0,03%) (53). Observa-se uma sazonalidade da patologia – mais frequente no Verão - coincidindo com um aumento também na colonização em avicultura (54).

No homem, o quadro clínico associado à infecção por *Campylobacter* varia desde uma diarreia aquosa sem sangue até a uma diarreia inflamatória severa sanguinolenta com dor abdominal, dor de cabeça, náusea e febre (55-58). Os sintomas duram entre 2 a 5 dias, podendo chegar aos 10 dias sendo a maioria das campilobacterioses entéricas autolimitadas. Contudo a infecção pode ter complicações autoimunes como a Síndrome de Guillain-Barré e Miller Fisher (59-64), artrite reativa (65, 66), síndrome do intestino irritável (67, 68), doença inflamatória intestinal e outros problemas gastrointestinais. Infecções sanguíneas por *C. jejuni* e *C.coli* são menos frequentes, embora possam surgir em doentes imunocomprometidos.

Na Europa, a média de prevalência ronda até os 70% na **produção primária** nos *broilers* (53). As fezes de frango infetado podem conter até  $10^5$ - $10^9$  UFC/g, permitindo a disseminação fácil da bactéria pelo ambiente (54, 69). Há vários fatores que podem influenciar a colonização, incluindo a idade, a dose infetante e a estirpe (70). A contaminação ocorre entre os animais da exploração, onde a transmissão pode ser vertical (pelo ovo), apesar de raramente considerado (42), ou horizontal entre os ambientes, considerando uma taxa de transmissão de 2,37 novas infecções por ave infetada por dia. Ou seja, após um animal ser contaminado, 95% dos animais ficam contaminados após uma semana (considerando 20 mil animais) (71-73). A infecção pode ocorrer nos primeiros dias de vida mas a presença do organismo nas fezes só é detetada após a segunda ou terceira semana de vida (74). A razão deste tempo continua desconhecido, mas desconfia-se ser consequência dos anticorpos parentais ou do efeito competitivo do microbioma (75, 76).

A prevalência no matadouro sobe consideravelmente para 75%, devido às contaminações cruzadas (54). Durante o abate, os pontos críticos para a contaminação são a depena, evisceração e a lavagem final. O tratamento com águas acima de 60° C (escaldão) causa um decréscimo da quantidade bacteriana que, contudo, aumentam na depena, devido à contaminação cruzada, e na evisceração em consequência do rompimento dos compartimentos digestivos (77-79).

## Prevenção e Controlo

Um programa de vigilância da campilobacteriose pode fornecer informações cruciais sobre a importância e a presença da doença, tal como identificar as vias mais comuns da transmissão do agente. Esta vigilância deverá ser feita a nível nacional com informações de todas as regiões, inclusive a notificação de casos e a tipificação dos isolados humanos e animais (10). A WHO reconhece o potencial de vacinas anti-*Campylobacter* para humanos e animais. Nos humanos, preveniria não só a infeção como as sequelas, com uma redução considerável de doentes, principalmente nas populações de risco, como crianças e idosos. Contudo são necessárias mais investigações (10).

Todo o tipo de avicultura pode ser colonizada por *Campylobacter* spp. (80). A transmissão vertical pelos ovos é pouco considerada como hipótese (81). A maioria dos ovos é livre de *Campylobacter* spp. na incubação. Uma vez a bactéria introduzida num grupo de aves, ela dissemina-se facilmente para todos os animais, através das fezes (até 10<sup>9</sup> UFC/g de fezes), mantendo-se até aos 42 dias. A colonização não determina o início dos sinais clínicos ou a redução do tempo de vida, podendo ser totalmente assintomática. Geralmente os *broilers* até às 6 semanas são colonizados por *C. jejuni*, enquanto nos animais mais velhos predomina *C. coli* (82, 83). A avicultura constitui o maior reservatório de *Campylobacter* spp. Reduzir a contaminação nas explorações fará diminuir a probabilidade de disseminação no matadouro, retalho e consumo e, assim, a incidência da doença no homem (54).

A melhor atitude efetiva na prevenção de introdução de *Campylobacter* spp. nas explorações é a **biossegurança** que impede não só a contaminação numa exploração, como também entre pavilhões, tendo como objetivo sempre o impedimento da contaminação da primeira ave (35, 84-87). Isto inclui: (i) barreiras de biossegurança para os funcionários quando se deslocam entre os pavilhões (barreiras de higiene, mudança de vestuário, pedilúvios), sendo que só com esta medida se poderá reduzir cerca de 50% das infeções (84); (ii) controlo de insetos, podendo reduzir até 77% das infeções (88-93); (iii) desinfeção de jaulas de transporte e veículos (desbaste), podendo desta forma reduzir até 35% da sua carga bacteriana (94); (iv) controlo estrito no acesso de animais às explorações (aves, roedores e outros animais), podendo reduzir até 26% (85, 92); (v) eliminação de águas acumuladas e purificação da água de beber (clorização) (42, 95); (vi) desinfeção e limpeza de ferramentas e de

todo o pavilhão (apenas a limpeza não é eficaz) (94) e (vii) reduzir os níveis de humidade no alimento e na cama.

Além das medidas de biossegurança e higiene indicadas, existem mais duas frentes distintas para controlo da população de *Campylobacter* spp. nas explorações como estratégias nutricionais e imunes.

As **estratégias nutricionais** consistem em administrar suplementos de produtos ou microrganismos com atividade anti-*Campylobacter*. Contudo, os estudos são por vezes contraditórios e difíceis de comparar devida a diferença dos parâmetros, como o tipo de aves, as estirpes bacterianas, condições de crescimento, entre outros, sendo necessários mais estudos para efetivamente comprovar a eficácia destas estratégias. Vários estudos *in vitro* mostram eficácia de certas medidas, o que não se verifica *in vivo*. São exemplos os ácidos orgânicos e gordos como o ácido caprílico (96-98), ácidos gordos de cadeia intermédia (99), ácido fórmico e sorbato (100), ácido láctico (101), acidificação (102) ou monocaprin (103). Os óleos essenciais e compostos derivados de plantas também parecem ser promissores no controlo de *Campylobacter* spp. (104). Outra possibilidade é o uso de probióticos como *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (105) ou *Bifidobacterium* (106), que promovem a competição bacteriana, a espessura das vilosidades intestinais e a resposta imune (104, 107, 108). No tubo digestivo das galinhas, as bacteriocinas (péptidos com atividade antimicrobiana) produzidas pelas bactérias ácido lácticas como *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*, são também promissoras, podendo-se selecionar um alvo específico sem influenciar a restante microflora. Geralmente, as bacteriocinas formam poros nas membranas, permitindo a entrada de iões e desestruturando a síntese da parede celular (109). São mais eficazes que os probióticos, visto estarem em maior concentração. O L-1077 de *Lact. salivarius* (110), o E-760 e E 50-52 de *Enterococcus* spp. (111, 112) são exemplos já estudados.

Por fim, os bacteriófagos, sendo específicos de hospedeiros e com interações específicas entre a cauda dos bacteriófagos, os recetores e as proteínas bacterianas, podem atuar nas bactérias patogénicas sem alterar o microbioma. Têm um efeito imediato, sendo ideal para utilização no período pré-abate. Já foram descritos vários bacteriófagos para *Campylobacter* (113, 114). Também é possível administrar um cocktail de bacteriófagos, revelando a mesma eficácia que usados individualmente, tendo contudo mais espécies alvo (115-118).

As **estratégias imunes** consistem em administrar anticorpos ou vacinas. O objetivo é provocar uma resposta imune específica anti-*Campylobacter*, principalmente a nível da mucosa para neutralizar e eliminar a colonização (54). Pode ser através de imunização passiva que, como já referido, os anticorpos maternos protegem os pintos nas primeiras semanas. Dessa forma, pretende-se prolongar essa imunidade. Não há estudos dos efeitos a longo prazo de imunização passiva. Contudo, é uma possibilidade para o período pré-abate. São exemplos as imunoglobulinas tipo Y (IgY) específicas de *Campylobacter* (119) ou o lisado de células de *C. jejuni* (120). Também

poderemos recorrer à vacinação com vacinas inativadas inteiras como a vacina resultante da inativação de *C. jejuni* com formalina (121) ou de flagelinas purificadas de *C. jejuni* (122). Outro estudo refere a possibilidade de vacinação do ovo e depois um reforço oral (123). Outra possibilidade de vacinas são as inativadas com sub-unidades que foram o primeiro tipo de vacina estudada em frangos, com utilização de flagelinas (124, 125) ou administração em conjunto com nano partículas por via intranasal (126). Contudo, a flagelina não pode ser aplicada em larga escala devido às diferenças entre as estirpes de *Campylobacter* e ao facto de outras bactérias poderem também ser suscetíveis. Já foram estudados outros métodos imunológicos como a proteína *CjaA* que está envolvida no transportador ABC (127, 128), as proteínas de membranas com nanopartículas por via subcutânea (129), a proteína *FlpA* (125) ou mesmo antígenos vetorizados por microrganismos como *Salmonella* que possuem plasmídeos que funcionam como antígenos (128, 130-132).

O ideal é aplicar estratégias combinadas para obter efeitos cumulativos. Existem várias discrepâncias entre estudos, com vários fatores que poderão fazer variar os resultados, como as estirpes aviárias, a dose e virulência bacterianas, as doses e protocolos de administração, entre outros. A nível nutricional, *in vivo* estas estratégias acabam por ter piores resultados devido à degradação pelo trato gastrointestinal, podendo mesmo atuar noutras bactérias da microbiota. As vacinas, ainda não estão disponíveis no mercado, sendo uma das áreas em forte desenvolvimento (54).

Contudo, estas estratégias não são suficientes se não existir uma atitude simultânea no transporte para o matadouro que evite a contaminação cruzada (133, 134). Outra fase importante é a seleção dos animais, o transporte para o matadouro e o tempo de espera no cais. A remoção da comida e de bebida antes da recolha para abate (apanha) tem impactos significativos, porque as fezes aumentam a contaminação durante o transporte e nas águas residuais (135-137), sendo este considerado uma parte integral do controlo após a apanha. Obviamente uma boa higiene é crucial para o controlo. Medidas como a limpeza, desinfeção, secagem dos materiais de transporte (jaulas), uma adequada densidade, desinfetar as superfícies que entram em contacto com as carcaças para evitar a contaminação cruzada, uso de protocolos de higiene e segurança alimentar adequados, são essenciais para mitigar a contaminação cruzada. A descontaminação da carcaça com processos físicos e químicos parece ser a melhor estratégia para diminuição da carga bacteriana (138, 139). Os métodos incluem o uso de grandes volumes de água para a lavagem da carcaça num fluxo em contracorrente, o congelamento de carcaças, o tratamento de carcaças com calor (vapor) ou a irradiação. A descontaminação química inclui o uso de compostos clorados, ácidos orgânicos, ozono, ácido peracético, peróxido de hidrogénio, fosfato trissódico ou o uso de métodos naturais como bacteriófagos e bacteriocinas.

Finalmente, a carne poderá chegar contaminada ao mercado. Nesse ponto, são essenciais as medidas de controlo aplicadas pelos distribuidores, retalhistas e consumidores. O não consumo de carne malcozinhada, as boas práticas de higiene na preparação (lavagem de mãos antes e depois



da manipulação, separação de produtos crus/cozinhados, intercâmbio de utensílios, lavar e desinfetar todas as superfícies e utensílios, a não lavagem dos alimentos para não aumentar a propagação) são medidas essenciais. *Campylobacter* é sensível a temperaturas de cozedura, sendo adequado o uso de temperaturas superiores a 70° C.

### **Resistência a antimicrobianos**

A resistência aos antibióticos é uma crescente preocupação devido ao elevado número de casos de campilobacteriose e ao facto de algumas infeções no homem necessitarem de tratamento com antibióticos. Geralmente este tratamento não é necessário pois são infeções autolimitadas e resolvem-se nalguns dias. Porém o tratamento efetivo diminui a duração da doença, sendo importante nas infeções severas e prolongadas, particularmente nas crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (140). O tratamento humano envolve o uso de macrólidos, sobretudo nas crianças, e fluoroquinolonas nos adultos (53, 140). A administração intravenosa de aminoglicosídeos só é usada nas bacterémias e outras infeções sistémicas (141). Os beta-lactâmicos não são recomendados para tratamento de campilobacterioses mas a administração oral de amoxicilina e ácido clavulânico pode ser uma opção quando há resistência às fluoroquinolonas e macrólidos (142, 143). Está descrito que *C. coli* é mais resistente do que *C. jejuni* provavelmente devido ao *cost-fitness* que algumas mutações associadas à resistência, sobretudo aos macrólidos, têm em *C. jejuni* e não em *C. coli* (144).

As fluoroquinolonas foram inicialmente introduzidas em 1980 sendo logo identificadas estirpes de *Campylobacter* spp. resistentes na Europa (141). Desde então, tem aumentado drasticamente a prevalência da resistência, suspeitando-se que a alta resistência às fluoroquinolonas seja devida ao seu uso habitual na medicina veterinária (enrofloxacin e danofloxacin) no tratamento de frangos não só no controlo de *Campylobacter* spp. como em doenças respiratórias (145-147). Na Austrália, onde o seu uso não está aprovado, a resistência é rara (2%) (148). Em Portugal foi observado um alto nível de resistência a quinolonas (100% ao ácido nalidíxico e mais de 90% à ciprofloxacina) (149). Segundo a EFSA, o elevado nível de resistência às fluoroquinolonas obriga a que esta família de antimicrobianos já não seja considerada para tratamento em humanos. Praticamente todos os isolados que são resistentes à ciprofloxacina e eritromicina também o são à tetraciclina (13).

A segunda classe crítica de antibióticos são os macrólidos. Em *C. coli* a resistência ronda os 50 a 60% nos isolados humanos obtidos em Portugal, o que contrasta com os cerca de 5% em *C. jejuni* (13), devido ao impacto negativo que as mutações associadas à resistência têm no *fitness* desta última espécie (144). No entanto, outros mecanismos, como a presença de genes específicos ou alterações nas bombas de efluxo (BE) podem levar à disseminação de clones resistentes mesmo em *C. jejuni*.

A resistência ao fenicol é baixa sendo mais frequente em *C. jejuni* (150, 151).

**Tabela 1.** Variação ao longo dos anos das taxas de resistências antimicrobianas publicadas pela EFSA/ECDC e os resultados obtidos. Legenda: <sup>c</sup>*C. coli*, <sup>i</sup>*C. jejuni*, <sup>h</sup>amostra humana, <sup>b</sup>amostra cecal de broiler,

Antibiótico		2010	2012	2015	2016	Portugal 2016	Resultados
Fluoroquinolonas	Ácido Nalidíxico	76% <sup>cb</sup> 69% <sup>ch</sup> 43% <sup>jb</sup> 50% <sup>jh</sup>	76% <sup>cb</sup> 70% <sup>ch</sup> 41% <sup>jb</sup> 53% <sup>jh</sup>		85% <sup>cb</sup>  62% <sup>jb</sup>	88% <sup>jb</sup>	
	Ciprofloxacina	84% <sup>cb</sup> 66% <sup>ch</sup> 47% <sup>jb</sup> 52% <sup>jh</sup>	78% <sup>cb</sup> 69% <sup>ch</sup> 44% <sup>jb</sup> 54% <sup>jh</sup>	71% <sup>ch</sup>	88% <sup>cb</sup> 64% <sup>ch</sup> 67% <sup>jb</sup> 54% <sup>jh</sup>	100% <sup>ch</sup> 96% <sup>jb</sup> 94% <sup>jh</sup>	100% <sup>cb</sup>  100% <sup>jb</sup>
				61% <sup>jh</sup>			
Macrólidos	Eritromicina	15% <sup>cb</sup> 11% <sup>ch</sup> 0,5% <sup>jb</sup> 2% <sup>jh</sup>	12% <sup>cb</sup> 15% <sup>ch</sup> 0,4% <sup>jb</sup> 1% <sup>jh</sup>	14% <sup>ch</sup>	1% <sup>cb</sup> 11% <sup>ch</sup> 1% <sup>jb</sup> 2% <sup>jh</sup>	50% <sup>ch</sup> 10% <sup>jb</sup> 7% <sup>jh</sup>	80% <sup>cb</sup>  0% <sup>jb</sup>
Tetraciclínas		73% <sup>cb</sup> 32% <sup>ch</sup> 32% <sup>jb</sup> 21% <sup>jh</sup>	73% <sup>cb</sup> 50% <sup>ch</sup> 34% <sup>jb</sup> 28% <sup>jh</sup>	69% <sup>ch</sup>	62% <sup>cb</sup> 65% <sup>ch</sup> 51% <sup>jb</sup> 43% <sup>jh</sup>	91% <sup>ch</sup> 82% <sup>jb</sup> 82% <sup>jh</sup>	97% <sup>cb</sup>  98% <sup>jb</sup>
Aminoglicosídeos	Gentamicina	8% <sup>cb</sup> 0,1% <sup>ch</sup> 0,8% <sup>jb</sup> 0,3% <sup>jh</sup>	4% <sup>cb</sup> 2% <sup>ch</sup> 0,7% <sup>jb</sup> 0,2% <sup>jh</sup>	2% <sup>ch</sup>	0,6% <sup>cb</sup> 2% <sup>ch</sup> 0,1% <sup>jb</sup> 0,4% <sup>jh</sup>	0% <sup>ch</sup> 0% <sup>jb</sup> 0,6% <sup>jh</sup>	7% <sup>cb</sup>  4% <sup>jb</sup>
				0,8% <sup>jh</sup>	16% <sup>cb</sup> 6% <sup>jb</sup>	2% <sup>jb</sup>	
B-lactâmicos	Ampicilina	25% <sup>ch</sup>	36% <sup>ch</sup>				87% <sup>cb</sup>
		30% <sup>jh</sup>	35% <sup>jh</sup>				73% <sup>jb</sup>
	Amox+Ácido Clavulâmico	0,2% <sup>ch</sup> 2% <sup>jh</sup>	1% <sup>ch</sup> 1% <sup>jh</sup>	4% <sup>ch</sup> 2% <sup>jh</sup>	3% <sup>ch</sup> 0,6% <sup>jh</sup>		0% <sup>cb</sup>
							0% <sup>jb</sup>
Co-Resistências	Ciprofloxacina + Eritromicina		9% <sup>cb</sup> 16% <sup>ch</sup> 0,2% <sup>jb</sup> 1,4% <sup>jh</sup>	12% <sup>ch</sup>	1% <sup>cb</sup> 8% <sup>ch</sup> 1% <sup>jb</sup> 0,6% <sup>jh</sup>	50% <sup>ch</sup> 10% <sup>jb</sup>	97% <sup>cb</sup>  98% <sup>jb</sup>
				0,7% <sup>jh</sup>			
MDR (pelo menos 3 classes)			23% <sup>cb</sup> 35% <sup>ch</sup> 2% <sup>jb</sup> 25% <sup>jh</sup>	11% <sup>ch</sup>	2% <sup>cb</sup> 8% <sup>ch</sup> 1% <sup>jb</sup> 2% <sup>jh</sup>	47% <sup>ch</sup> 10% <sup>jb</sup> 7% <sup>jh</sup>	91% <sup>cb</sup>  73% <sup>jb</sup>
				1% <sup>jh</sup>			
Totalmente Suscetíveis			12% <sup>cb</sup> 6% <sup>ch</sup> 48% <sup>jb</sup> 18% <sup>jh</sup>	15% <sup>ch</sup>	11% <sup>cb</sup> 14% <sup>ch</sup> 28% <sup>jb</sup> 34% <sup>jh</sup>	0% <sup>ch</sup> 3% <sup>jb</sup> 4% <sup>jh</sup>	0% <sup>cb</sup>  0% <sup>jb</sup>

Na Tabela 1, pode observar-se a variação das resistências de *Campylobacter* spp. ao longo dos anos segundo a EFSA. Em 2016, Portugal testou 67 isolados de frangos, tendo obtido mais de 95% de resistência à ciprofloxacina (estando, com a Letónia, no topo da resistência para *C. jejuni*) e 10,4% à eritromicina, dividindo neste caso o topo com a Bulgária. Também para a tetraciclina, Portugal encontra-se no topo, com 82,1% de resistência. A MDR é definida quando a espécie bacteriana é resistente a pelo menos 3 classes de antibióticos diferentes, sendo a frequência de MD em Portugal de 10,4%, ocupando também o nosso país o primeiro lugar relativamente a *C. jejuni*. As

maiores taxas de resistência à ciprofloxacina são observados nos países da Europa oriental e do sul, enquanto para a eritromicina destacam-se Portugal, Itália e Bulgária como os países com mais resistências, apresentando também maior resistência combinada ciprofloxacina/eritromicina (13).

A diferença das resistências entre os isolados humanos e animais é mais significativa em *C. jejuni*. Contudo, esta diferença pode ser devida ao número de isolados testados ou mesmo ao consumo de carne importada (13).

Uma revisão recente não conseguiu estabelecer uma relação causal entre o uso de antibióticos na produção e a prevalência de estirpes resistentes em humanos mas concluiu que a pressão seletiva dos antibióticos aumenta a colonização de animais com *Campylobacter* spp. resistentes (152).

### Mecanismos de Resistência Antimicrobiana

*Campylobacter* spp. desenvolveu vários mecanismos de contornar a pressão seletiva dos antibióticos. Estes mecanismos podem funcionar em conjunto para os diferentes grupos de antibióticos (153), através de um mecanismo de (i) restrição do acesso dos antibióticos ao seu sítio alvo, mediante redução da permeabilidade da membrana ou efluxo pelas BE; (ii) modificação ou proteção das moléculas alvo dos antibióticos e (iii) modificação ou inativação dos próprios compostos antibióticos.

A resistência às **Fluoroquinolonas** por *Campylobacter* spp. baseia-se em mutações que alteram o alvo das fluoroquinolonas (DNA gyrase) e que reduz a acumulação intracelular do antibiótico (153). A mutação mais frequente no gene *gyrA* é a substituição C257T, que parece ser estável e sem custos biológicos, permanecendo mesmo sem pressão do antibiótico (154). Pode-se, portanto, antecipar que o nível de resistência permanecerá alto, mesmo com o término ou redução no uso do antibiótico. Ao nível do aminoácido, a mutação mais frequente (Thr-86-Ile) confere altos níveis de resistência (com uma Concentração Mínima Inibitória - CMI >16 µg/ml), enquanto que as restantes mutações só conferem resistências a concentrações entre 1 a 8 µg/ml. Recentemente, no Japão, foi reportada resistência em *C. jejuni* sem qualquer mutação no *gyrA* e, pelo contrário, foram isoladas estirpes suscetíveis às fluoroquinolonas, com a mutação C257T (22). Estudos referem que sem uma BE funcional, a mutação da *gyrA* não é suficiente para a bactéria sobreviver ante concentrações inibitórias (169).

As **bombas de efluxo** (BE) do tipo RND (*Resistance-Nodulation-Division*) podem proteger as bactérias das substâncias naturais produzidas pelas células do hospedeiro como a biliar, hormonas e moléculas de defesa, e são capazes de conferir resistência estrutural a diversos antibióticos. O seu mecanismo baseia-se na redução da concentração dos vários compostos no interior da célula bacteriana. Em *C. jejuni*, as mutações na BE CmeABC, tipo RND, provocam o aumento da CMI de vários antibióticos, como a ciprofloxacina, eritromicina, cefotaxima, rifampicina, gentamicina e tetraciclina (155). Os 9% de isolados *C. coli* reportados em 2016 são resistentes à ciprofloxacina,

eritromicina e tetraciclina, tendo a BE um papel nesta multirresistência, para além das mutações em genes alvos específicos (13). Na China foi descoberta uma nova variante da BE, RE-CmeABC que, em conjunto com a mutação C257T no *gyrA*, confere uma CMI à ciprofloxacina extremamente alta (>256 ug/ml), e resistências também à tetraciclina, florfenicol e eritromicina. A região codificadora de RE-CmeABC pode ser transferida entre isolados de *Campylobacter* por transformação natural e a CMI relativamente ao florfenicol, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina aumenta (156). Suspeita-se que esta super BE esteja presente na Europa há mais de 10 anos, mas como não se realiza rotineiramente a determinação da CMI para a ciprofloxacina e florfenicol, não é possível identificá-la fenotipicamente (13).

As **tetraciclinas** previnem o crescimento bacteriano por inibição da síntese proteica da sub-unidade ribossomal 30S. O mecanismo de resistência mais importante resulta da aquisição de gene *tet(O)* que extrai o antibiótico do seu interior e confere proteção ribossomal (157). A sua proteína liga-se à tetraciclina e promove a sua libertação do alvo. O gene pode estar localizado no cromossoma ou plasmídeo, sendo considerado que foi adquirido horizontalmente. A BE CmeABC também contribui para a resistência intrínseca e adquirida a esta classe de antibióticos (158).

Os **aminoglicosídeos** têm a sua ação também na sub-unidade ribossomal 30S. A gentamicina é, por vezes, usada para o tratamento de campilobacterioses sistémicas em humanos e também na metafilaxia praticada nos primeiros dias de vida em avicultura. A resistência aos aminoglicosídeos pode ser devida a três tipos de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME): aminoglicosídeo acetiltransferase, aminoglicosídeo nucleotidiltransferase e aminoglicosídeo fosfotransferase. Assim, *aadA* e *aadE* conferem resistência à estreptomicina, *aacA4* à gentamicina e tobramicina e 3'APHs à canamicina e neomicina (13). Na China identificaram vários genes de AME na ilha genómica cromossomal que está particularmente presente em *C. coli* do ST 1625, podendo ser transferível a *C. jejuni* (159). O gene *aacA4* foi inicialmente encontrado em *C. jejuni* (160). Em 2017 identificaram um novo gene AME, *aph(2'')-If*, localizado num segmento cromossómico (anteriormente apenas em plasmídeos) que contém sete outros AME e o *cat* (gene que confere resistência a cloranfenicol). Este segmento também pode ser transferido, conferindo resistência à gentamicina, amicacina, canamicina e neomicina. Os altos níveis de resistência à gentamicina devem-se a ambos os casos: ao gene particular ST1625 e ao gene *aph(2'')-If* transferido horizontalmente (159, 161).

**Fluorofenicol** liga-se ao centro peptidiltransferase prevenindo a elongação da cadeia do péptido, o que resulta na inibição da síntese proteica e morte bacteriana. Ao longo dos anos a bactéria desenvolveu mecanismos para contrariar a pressão seletiva, incluindo a modificação ou proteção do alvo e a diminuição da concentração intracelular por redução da permeabilidade e aumento do efluxo (153). O gene *cfr(C)* foi recentemente descrito em *Campylobacter* (162), tendo sido descrito anteriormente noutras bactérias como conferindo resistência aos fenicóis, lincosamidas,

estreptogramina A, pleuromutilinas e oxazolidinona (PhLOPS<sub>A</sub>). Este gene funciona como uma metiltransferase, metilando a posição A2503 do RNAr 23S, que é o alvo destes antibióticos (163). A resistência é adquirida por transferência por conjugação através de plasmídeo. Estas descobertas estabeleceram o *cfr*(C) como um novo gene associado ao fenótipo de MDR. O CmeABC na *C. jejuni* tem um efeito limitado no efeito de resistência ao florfenicol (162) pelo contrário, a super BE RE-CmeABC é muito mais potente na resistência ao florfenicol (156). Um outro gene, *floR*, que codifica uma BE mediando a resistência, também foi descrita em *C. coli* (164).

Os **beta-lactâmicos** inibem o crescimento da bactéria por inibição da síntese do peptidoglicano na parede celular. Estão descritos dois mecanismos de resistência em *Campylobacter*: a produção da enzima beta-lactamase *BlaOXA-61* e alterações na BE (153). A resistência é mais comum em *C. coli* e associada à mutação no *blaOXA-61*, havendo outro gene ainda não caracterizado (143). Mutações na BE CmeABC promovem resistência a esta classe de antibióticos (158).

Os **macrólidos** atuam na inibição da síntese de proteínas por ligação à sub-unidade RNAr 23S e às proteínas ribossomais. Em *Campylobacter* spp., a resistência resulta geralmente de mutações no RNAr 23S (as mutações A2074G, A2074C, A2074T e A2075G, são as mais frequentes) ou nas proteínas ribossomais L4 e L22 (genes *rpID* (G74D) e *rpIV* (A103V)), que conferem elevados níveis de resistência à eritromicina (165, 166). Estas mutações geralmente têm custos biológicos para a bactéria, podendo explicar a relativa baixa prevalência, sobretudo em *C. jejuni* (167). Recentemente, descobriu-se que existem resistências transferíveis horizontalmente à eritromicina, inicialmente descrita em isolados de *C. coli* de animais em 2014 na China (168) e frequentemente resultam numa CMI elevada (>512 mg/L), havendo, contudo, também níveis intermédios (16 µg/L) (169). Na Europa, o primeiro isolado descrito foi em Espanha, em 2016 (170). Esta resistência é conferida pelo gene adenina metiltransferase rRNA, *erm*(B), que é frequentemente associado com outras ilhas de multiresistência cromossômicas (MDRGI) ou plasmídeos transferíveis em espécies de Gram-positivo, isolados em suínos, e a sua transferência por via horizontal para *Campylobacter* pode resultar da pressão de outros antibióticos, como tetraciclina e aminoglicosídeos. A BE CmeABC (gene *cmeB*) também já foi verificada, ajudando a ampliar a resistência (158). O gene emergente *ermB* poderá disseminar rapidamente, podendo ser um grave problema, tal como ocorreu com a resistência à tetraciclina, mediada pelo gene *tetO*. Contudo, a remoção do antibiótico poderá reduzir a prevalência da resistência (166).

**Ilhas genómicas de multiresistências (MDRGI)** – Do ponto de vista epidemiológico, as resistências transmitidas horizontalmente são extremamente importantes. A resistência conferida pelo gene metilase rRNA *erm*(B), é frequentemente associada com ilhas de multiresistência cromossômicas. Esta emergência da presença do gene é alarmante por conferir níveis altos de resistência à macrólidos. O *erm*(B) no MDRGI pode se transferir de *C. coli* para *C. jejuni* por transformação natural. Além do *erm*(B), estas MDRGI contêm também os genes *aac*, *aadE*, *aacA*-

*aphD*, *aadE-sat4-aphA3* e *tet(O)* que conferem resistência aos macrólidos, lincosamidas e aminoglicosídeos. Quando a MDRGI está presente num isolado de *C. coli* resistente à tetraciclina e fluoroquinolonas; esta estirpe é resistente a todos os fármacos usados no tratamento das campilobacterioses. Existem seis tipos de MDRGI cromossômicos (tipo I a VI) caracterizados, sendo o tipo III o mais frequente tanto em estirpes humanas como em estirpes animais. Todos os seis tipos cromossômicos podem ser transferíveis por transformação, ao contrário dos plasmídeos (13).

## 2. *Helicobacter pullorum*

*Helicobacter pullorum* foi descoberta por Stanley em 1994, que descreveu organismos tipo *Campylobacter* (CLO - *Campylobacter-like organisms*) no fígado, duodeno e ceco de galinhas assintomáticas, com enterite ou hepatite vibrionária e também em humanos com gastroenterite. Dado a sua distinção genética com *Campylobacter* spp., foi classificada como uma nova espécie pertencente ao género *Helicobacter* (171). *H. pullorum* é uma bactéria de Gram-negativo, com 3 a 4 micrómetros de comprimento e 0,3 a 0,5 µm de largura, com uma forma ligeiramente curvada (vulgarmente referida em forma de vírgula) ou espiralada. É móvel, não formadora de esporos, possuindo um único flagelo polar sem bainha, crescendo em atmosfera de microaerofilia preferencialmente enriquecida com 5% hidrogénio e temperaturas entre 37 a 42° C típicas das bactérias mesófilas) (172, 173). É produtora de catalase, oxidase e reduz os nitratos, sendo negativa para a síntese de acetato de indoxil, esterase, urease e hidrólise de hipurato (174). Morfologicamente, as colónias de *H. pullorum* são morfologicamente branco-acinzentadas, de tamanho reduzido e hemolíticas (175). Filogeneticamente, *H. pullorum* é mais semelhante a *Helicobacter rodentium*, *Helicobacter canadensis*, *Wolinella succinogenes* e *C. jejuni*, suspeitando-se que *H. pullorum* descendam da mistura de linhas entre elas, principalmente entre *H. canadensis*, por partilharem os mesmos hospedeiros e locais de colonização e *C. jejuni*, dada a semelhança com a *Campylobacter major protein (cmp)*. Entre *H. pullorum* é visível a constituição mista de *clusters* independentemente das regiões e da origem dos isolados (humanos ou animais). Relativamente à variabilidade das estirpes, observa-se uma maior diversidade dos isolados provenientes de produções ao ar livre do que os isolados provenientes de produções intensivas convencionais (3, 176-179).

## Prevalência

Trata-se de uma bactéria pertencente às espécies de *Helicobacter* enterohepáticas (HEH), que coloniza predominantemente o intestino e o sistema hepatobiliar do hospedeiro (180). *H. pullorum* infecta aves, algumas espécies de roedores e humanos. Tem vindo a ser associada às gastroenterites na avicultura, hepatites vibrionárias em frangos (181) e a gastroenterites nos humanos (8, 9, 181). Contudo, também existe em aves assintomáticas (171, 182). Relativamente às hepatites vibrionárias, a sua etiologia por *H. pullorum* ainda não está suficientemente comprovada, contudo os estudos apresentados obtiveram baixa prevalência de *H. pullorum* e a virulência das estirpes parece ser

importante na infecção (180, 183, 184). A colonização dos fígados pode ser explicada através do movimento retrógrado pelo duodeno ou pela circulação portal a partir do lúmen intestinal (175).

A tabela 2 resume as prevalências de *H. pullorum* publicadas nos diversos países, podendo-se verificar uma grande variabilidade nas diferentes regiões. Em Portugal, apenas existe um estudo publicado, sendo as amostras recolhidas em carcaças já no mercado, tendo-se obtido uma prevalência de 23,5% (179). Em Itália, comparou-se o tipo de produção, tendo a prevalência descido de 100% nas produções intensivas convencionais e biológicas para 57,1% nas produções com acesso ao exterior (185). Contudo, um estudo na Índia mostrou não haver diferenças entre os diferentes tipos de produções, e nem ao nível de resistências antimicrobianas, podendo ser indicativo da capacidade de adquirir genes horizontalmente por contaminação ambiental (3, 186-188). Pode-se também verificar que num estudo realizado no Egipto, não se observou a presença de *H. pullorum* em patos nem em perus (172). Na Malásia, um estudo concluiu ainda que 50% das infeções de *H. pullorum* estão acompanhadas por infeções de *Campylobacter* spp. (189).

Vários estudos já demonstraram que o ceco parece ser o local preferencial para a colonização de *H. pullorum*, seguido do cólon, jejuno e só por fim o fígado (175, 190). *H. pullorum* tem ainda a capacidade de contaminar a carcaça e é por esse motivo considerado um agente patogénico transmissível pelos alimentos (179). Esta contaminação poderá estar associada à transferência cruzada durante o abate, desmancha e embalagem (6).

É sabido que a identificação de *H. pullorum* é subestimada ao nível do laboratório clínico, sendo frequentemente “identificada” como *Campylobacter* spp. (nomeadamente *C. lari*). O comportamento fastidioso, o longo tempo de incubação, a dificuldade de isolamento, os testes fenotípicos, bioquímicos, a semelhança morfológica nos meios de cultura seletivos frequentemente usados no isolamento de *Campylobacter* spp. parecem ser os motivos para o subdiagnóstico desta infecção (3, 191, 192). Para diferenciar *H. pullorum* de *Campylobacter* spp., pode realizar-se o teste da hidrólise do acetato de indoxil, para o qual o primeiro é negativo (193).

A presença da bactéria no intestino das **galinhas** parece ter maior impacto na fisiologia gastrointestinal do que propriamente provocar lesões patológicas. Kaakoush e colaboradores (2014) sugerem que a presença de *H. pullorum* afeta o microbioma, influenciando a sua abundância (194), não apresentando muitas vezes sinais clínicos (195). Há suspeita de poderem provocar uma maior taxa de mortalidade, sinais de diarreia, diminuição do ganho de peso e baixa conversão alimentar. Todos os ovos de galinha embrionados experimentalmente infetados apresentaram mortalidades embrionárias em 48h após a inoculação do saco vitelino (172). Contudo, o real impacto na fisiologia e saúde das aves, tal como a suscetibilidade à infecção, continuam desconhecidos.

**Tabela 2.** Resumo de prevalência de *H. pullorum* na avicultura e em humanos.

País	Amostras	Amostragem	Prevalência	Referências
Bélgica	Fezes humanas	531 (Gastroenterite)	4,3%	Celeen <i>et al.</i> , 2005
		100 (saudáveis)	4%	(184)
	<i>Broilers</i>	110 de 11 bandos (trato gastrointestinal e fígado)	33,6% (ceco)	Celeen <i>et al.</i> , 2006
			31,8% (colon)	(176)
			10,9% (jejuno)	
			4,6% (fígado)	
Itália	<i>Broilers</i> e poedeiras	60 (ceco)	100%	Zanoni <i>et al.</i> , 2007
				(5)
	Perus	55 (ceco)	76,4%	Zanoni <i>et al.</i> , 2011
				(186)
	<i>Broilers</i> (cecos)	169 (de 30 P. convencionais)	100%	Manfreda <i>et al.</i> ,
Malásia		39 (de 8 P. biológica)	100%	2011 (187)
		40 (de 7 P. ar livre)	57,1%	
	<i>Broilers</i> e Tradicionais	89	24,72%	Wai <i>et al.</i> , 2012 (89)
	<i>Broilers</i>	96 (ceco e colon)	55,21%	Beren and Seyyal.,
			32,29% (ceco)	2013 (188)
			10,15% (colon)	
Egipto			15,63%(ambos)	
	<i>Broilers</i> , Patos e Perus	1800 (zaragatoas cloaca, ceco e fígado)	60% ( <i>broilers</i> )	Hassan <i>et al.</i> , 2014
			0% (patos e Perus)	(173)
	Irão	100	6%	Jamshidi <i>et al.</i> , 2014
	<i>Broilers</i>	100 (ceco)	41%	(189)
Turquia	<i>Broilers</i>	120 (com gastroenterite)	7,5% (ceco)	Behro and Javadi,
			5% (fígado)	2015 (190)
			23,52%	
	Portugal	17		Borges <i>et al.</i> , 2015
				(180)
Índia	<i>Broilers</i> (cecos)	55 (P. convencional)	5%	Qumar <i>et al.</i> , 2017
		45 (P. ar livre)	6%	
				(3)

Nos **humanos**, *H. pullorum* foi isolado em infecções entéricas crônicas (8), colecistite, doenças hepáticas, cirrose (196-202), doença inflamatória intestinal (190, 203, 204) e mesmo bacteriemia com dor abdominal e diarreia profusa (205). Um estudo no Irão mostra uma prevalência de 6% nas fezes de doentes ou indivíduos saudáveis (206) contrastando com um outro estudo na Bélgica com uma prevalência de 4,3% nas fezes de pacientes com gastroenterite (9), demonstrando assim pouca coerência na sua associação. Contudo, a associação com a doença de Crohn e colelitíase está mais fortemente demonstrada (198, 203, 207-212).

### Patogenicidade e Virulência

Uma caracterização estrutural dos lipopolissacáridos (**LPS**) de *H. pullorum* revelou-a como a que possui maior atividade relativa do teste do lisado de amebócitos de *Limulus* entre as espécies de



*Helicobacter*, indicando, por isso, uma elevada atividade endotóxica. A capacidade do LPS de *H. pullorum* induzir, mediado pela interleucina 8 (IL-8), a atividade do fator nuclear-kappa B (NF-kB) nas células infetadas pode ser o impulsor da inflamação detetada nas gastroenterites, tal como ocorre com *H. pylori* (213). Esta hipótese foi reforçada recentemente, tendo sido demonstrado que *H. pullorum* possui sete genes que codificam para as endotoxinas do LPS (3). O LPS é uma endotoxina e importante ativador da resposta imunológica, ou seja, possui antígenos grupo-específicos na sua constituição, que são potentes estimuladores da resposta imune do hospedeiro (213). Entre diferentes estirpes, a resposta da IL-8 observada não foi muito variável, sugerindo que os fatores ligados ao hospedeiro serão igualmente importantes ou que outros fatores de virulência da bactéria também podem desempenhar um papel na indução da resposta inflamatória (214).

A enzima catalase é essencial para a proteção de *H. pullorum* contra o stress oxidativo (215). A bactéria é capaz de tolerar o stress provocado pela biliar, respondendo com proteínas específicas, como descrito por Hynes em 2003. A presença da histidina cinase (*FlgS*) e do regulador de resposta de proteínas (*FlgR*) sugere que possui o sistema de dois componentes (TCR) que lhe permite o controlo do metabolismo do azoto através da regulação da expressão da glutamato-desidrogenase (mais semelhante a *C. jejuni* do que a *H. pylori*), podendo assim crescer a várias temperaturas e em diferentes hospedeiros (3, 216, 217). Recentemente foram identificados 40 genes de virulência relacionados com a motilidade, que se pensa ser essencial para a colonização do ceco nos frangos (3). *H. pullorum* contém os genes do operão da BE da família RND, tendo função não só nas resistências a vários antibióticos como também para facilitar a adaptação da bactéria a diferentes ambientes como resistência aos metais pesados, poluentes orgânicos, biocidas, solventes e desintoxicação de metabolitos intermédios tóxicos (218). A presença desta BE sugere uma extraordinária defesa contra uma ampla gama de substratos dos hospedeiros, que pode também desempenhar um papel na adesão e invasão das células epiteliais (3). Estas características permitem que *H. pullorum* colonize e sobreviva plenamente no sistema entérico (inclusive na vesícula biliar) dos frangos. A transmissão de espécies HEH ocorre por via fecal-oral. Há ainda controvérsia sobre a existência ou não de formas cocóides, viáveis mas não aptas para serem cultivadas, no meio ambiente e, qual a sua importância na transmissão a hospedeiros suscetíveis (174). Até ao momento, contrariamente a *Campylobacter* spp., não existem dados sobre os fatores de risco associados à infeção por *H. pullorum*, existindo a possibilidade de a transmissão ser feita pela água (219).

Os hepatócitos humanos, as células da vesícula biliar e as células epiteliais do cólon infetados por *H. pullorum* apresentam um aumento da expressão de metaloproteínases de matriz (MMP-2 e MMP-9), responsáveis por contribuir para a degradação da matriz extracelular, permitindo assim o contacto da bactéria com as células do hospedeiro (220).

Um estudo português demonstrou ainda que *H. pullorum* consegue induzir a produção de óxido nítrico nos macrófagos murinos após internalização, estimulando citocinas pró-inflamatórias

como TNF- $\alpha$ , IL-1B, IL-6 e MIP-2 (221). *H. pullorum* possui 21 proteínas específicas imunogênicas identificadas, apresentando perfis similares com as de *H. pylori* (222). Geneticamente, já foram identificados 182 fatores de virulência em *H. pullorum*, sendo que 116 se encontraram em todos os isolados estudados (3).

À semelhança de *C. jejuni*, *H. pullorum* possui também o gene *cmp*, que codifica para uma proteína da membrana externa, tendo uma função antigênica importante, podendo ser uma potencial característica para desenvolvimento de vacinas (179).

Histologicamente, sabe-se que os organismos semelhantes a *H. pullorum* aderem intimamente à mucosa do trato gastrointestinal, tal como descrito para *C. jejuni* nas microvilosidades da borda em escova do intestino de galinhas e para *H. pylori* no estômago humano (223-225). Num ensaio em ambiente controlado, verificou-se, para os animais infetados com *H. pullorum*, a dilatação do ceco com conteúdo espumoso na primeira semana, tal como ocorre com *C. jejuni*, culminando com bandas castanhas escuras na serosa do ceco. *H. pullorum* encontra-se intimamente ligada ao epitélio cecal e foi encontrada nas criptas cecais. Este mesmo estudo comprovou a excreção da bactéria pelas fezes até aos 42 dias após infecção (180).

Existem 3 fatores de **virulência** principais descritos até ao momento:

1) Sistema flagelar bacteriano - adesinas;

*H. pullorum* consegue interagir com as microvilosidades intestinais através do seu flagelo, estimulando a produção de IL-8 e a colonização das células intestinais. Este processo de invasão provoca expansão da membrana da célula, resultando na degradação das microvilosidades intestinais e libertação de detritos celulares (215). *H. pullorum* consegue uma boa adesão com as células e estabilidade com o calor, devido a 20 proteínas funcionais de adesão (3), embora muito menor comparativamente a *Salmonella Typhimurium* ou a *C. jejuni*. Os fatores responsáveis pelos efeitos citopatogénicos nas células epiteliais por *H. pullorum* não estão bem identificados. A inflamação é potenciada pela toxina distensora citoletal e lipopolissacarídeos via ativação do NF- $\kappa$ B (9).

2) Toxina CDT secretada pelo sistema secretor de tipo 3 (T3SS)

A toxina distensora citoletal (CDT) foi inicialmente descrita em *E. coli* como causadora de anomalias celulares e morte celular (226). A CDT provoca edema, apoptose, anomalias citoesqueléticas e paragem no G2/M do ciclo celular das células de mamíferos (227). Provoca também diarreias agudas, encontrando-se, possivelmente, relacionada com o desenvolvimento de doenças inflamatórias do fígado e intestino (228), estando bem identificada em *C. jejuni* e noutras espécies de *Helicobacter*. Atualmente sabe-se que a infeção crónica por bactérias produtoras de CDT pode promover a transformação maligna e, posteriormente, cancro (229). Em *H. pullorum*, estão descritos dois fatores envolvidos na atividade citotóxica: a sub-unidade B da toxina distensora citoletal (CdtB) e um fator tóxico solúvel ainda não identificado, que causa uma divisão mitótica descontrolada

e necrose primária das células hepáticas (230). A CdtB, através da cortactina, induz um alargamento celular e nuclear acompanhado por uma remodelação profunda do citoesqueleto da actina com a formação de uma lamellipodia. Também ocorre um distúrbio na adesão focal e na ligação de microtúbulos. Estes efeitos podem provocar consequências profundas na adesão bacteriana e integridade da barreira intestinal (3, 207, 228). Adicionalmente, a CDT induz a inibição da proliferação de linfócitos T e B, a produção de anticorpos e a síntese de óxido nítrico pelos macrófagos (231).

Já foi encontrado um gene semelhante ao que codifica para a citotoxina vacuolizante de *H. pylori*, o gene *vacA*, marcador de doenças gástricas severas, podendo ser uma citotoxina adicional à CdtB conhecida em *H. pullorum* (179, 232).

### 3) Sistema secretor tipo VI (T6SS)

O T6SS é um sistema de virulência presente em várias espécies de Gram-negativo, composta por 13 componentes principais com semelhanças estruturais com os bacteriófagos (3, 233). Os bacteriófagos usam um tubo e um dispositivo de punção para penetrar o envelope celular e injetar o DNA (234). É proposto que o T6SS cria um caminho específico no envelope bacteriano para conduzir efetores e toxinas para a superfície das células eucarióticas, para aumentar a virulência e fortalecer a competição com outras espécies bacterianas (235). O T6SS consegue também perfurar outras células com que a bactéria esteja em contacto e injetar efetores (tipo *Hcp* e *VgrG*) que são componentes extracelulares, formando uma agulha que entra em contacto com as células, induzindo um rearranjo do citoesqueleto da actina e a produção de IL-6 e IL-8 (215, 236). O T6SS está associado com uma forma mais severa de diarreia e bacteremia nas infeções por *C. jejuni* (237). T6SS também tem sido associado a interações inter-bacterianas, que variam com a atividade bactericida e com o crescimento competitivo em biofilmes de cultura mista, sendo um fator importante para a aptidão ecológica das bactérias pertencentes a biofilmes mistos (238, 239). Nas amostras das carcaças recolhidas em Portugal, 3 dos 4 isolados de *H. pullorum* apresentaram os genes codificantes para um T6SS completo (179).

## Resistência a antimicrobianos

Apesar de a infeção por *H. pullorum* estar associada a gastroenterites e hepatites vibrionicas, não há recomendação de quais são os antibióticos a ser usados no seu tratamento. Sabe-se que *H. pullorum* é naturalmente sensível à Polimixina B, uma característica fenotípica distinguível das restantes espécies de *Helicobacter* spp. (4). Geralmente surgem como suscetíveis aos macrólidos e resistentes às quinolonas, contudo é muito variável (240). Na literatura foram encontrados apenas 10 estudos de resistência antimicrobiana a *H. pullorum*, estando os seus resultados resumidos na tabela 3.

**Tabela 3.** Taxas de resistências a antimicrobianos publicadas e genes/mutações associadas em *H. pullorum*.

Antibiótico		Taxa de resistência (fenotípicas)	Genes/mutações Associados
Fluoroquinolonas	Ácido Nalidíxico	6% <sup>b</sup> , 28% <sup>c</sup> , 55% <sup>d</sup> , 100% <sup>i</sup>	<b>gyrA</b> (ACA->ATA) <sup>h, i, k</sup>
	<b>Ciprofloxacina</b>	20% <sup>f</sup> , 80-83% <sup>i</sup> , 100% <sup>g, h</sup>	
	Enrofloxacin	0% <sup>e</sup> , 100% <sup>i</sup>	
Macrólidos	Claritromicina	67-80% <sup>i</sup>	<b>RNAr 23S</b> (AAA->GAA) <sup>h, k</sup>
	<b>Eritromicina</b>	0% <sup>e</sup> , 25% <sup>h</sup> , 27% <sup>f</sup> , 100% <sup>g</sup>	
<b>Tetraciclinas</b>	(oxitetraciclina, clotetraciclina, doxiciclina)	0% <sup>e, f, i</sup> , 25% <sup>h</sup> , 88% <sup>g</sup>	<b>RNAr 16S</b> (AGA->TGA) <sup>h, k</sup>
Aminoglicosídeos	Gentamicina	0% <sup>e, f</sup> , 100% <sup>g</sup>	(excepto um) tinham o gene de Resistencia aph(3'')-Ib e suspeita-se de mais dois. Suspeita-se ser por gene rpsE,
	Neomicina / Tobramicina	0% <sup>i, e</sup>	
	Spectinomycin	100% <sup>e</sup>	
Sulfonamidas/ trimetoprim	Co-trimoxazole / sulfametoxazole-trimetoprim	100% <sup>i, e</sup>	
Miscelaneus	Colistina	0% <sup>g, i</sup>	
Fenicol	Cloranfenicol	0% <sup>f, i</sup>	
	Rifampicina		4 mutações missense no <b>RpoB</b> (M517L, V557A, A561V T593A) <sup>k</sup>
Cefalosporinas	Cefalotina / Cefoperazona	100% <sup>a, b, f</sup>	
	Cefotaxima/ceftriaxona	100% <sup>e, h</sup>	
B-lactamases	Ampicilina	0% <sup>f, g</sup> , 100% <sup>e</sup>	
	ESBL production	100% <sup>i</sup>	
	Ácido Clavulâmico	100% <sup>i</sup>	

Fontes: <sup>a</sup>(171), <sup>b</sup>(173), <sup>c</sup>(4), <sup>d</sup>(241), <sup>e</sup>(183), <sup>f</sup>(5), <sup>g</sup>(242), <sup>h</sup>(179), <sup>i</sup>(3), <sup>k</sup>(243).

Para além das mutações associadas à resistência, em todos os isolados de *H. pullorum* foi encontrado o gene *cmeB* da BE da família RND, que pode estar implicado nas resistências aos antimicrobianos (3). Um isolado descrito em Portugal, apresentava resistência à ciprofloxacina sem apresentar mutação em nenhum gene conhecido, podendo dever-se à BE. Encontrou-se também em todos os isolados o gene de produção da família de piridoxamina 5'-fosfato oxidase que está associado a resistências a 5-nitroimidazol (179) tal como o gene *tufA* que confere resistência à elfamicina (3).

A suscetibilidade aos antimicrobianos é muito variável de acordo com a estirpe, principalmente em regiões geográficas distintas. As práticas de produção intensiva com frequente uso de antibióticos poderão ter contribuído para aumentar a resistência a antibióticos (244). A proibição de muitos destes

antibióticos na Europa a nível da produção animal, poderá resultar num perfil de resistência diferente do detetado noutras regiões (245, 246).

### III. OBJETIVOS DO ESTUDO

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a frequência de *Campylobacter* spp. e *H. pullorum* nos cecos e fígados de frangos de produção intensiva (*broilers*) ao nível do matadouro e proceder à sua caracterização fenotípica, incluindo perfil de resistência a vários antimicrobianos, caracterização genotípica por PCR convencional, sequenciação de Sanger e sequenciação do genoma total (*Whole genome sequencing* – WGS).

### IV. MÉTODOS E MATERIAIS

#### 1. Seleção das amostras

As amostras foram recolhidas numa unidade de abate de aves de capoeira da região centro do país. A recolha de amostras para estudo foi realizada em 5 datas diferentes: 15 e 29 de novembro, 5, 21 e 26 de dezembro de 2017.

A amostragem consistiu na recolha de cecos de frangos imediatamente após o processo de evisceração, sendo recolhido um ceco de cerca de 20 animais aleatória e uniformemente escolhidos do mesmo bando (n=26), com a finalidade de obter uma amostragem o mais representativa possível. Por este método não é considerado a possibilidade de contaminação cruzada entre os bandos. O número de bandos recolhidos por dia foi variável, entre 4 a 6 bandos, dependente do número de bandos abatidos no dia. Destes mesmos bandos, foram recolhidos também fígados com lesões típicas de hepatite víbriónica. As 26 amostras de ceco são de 18 explorações diferentes (4 explorações com amostras provenientes de pavilhões diferentes e em 2 explorações as amostras são do mesmo pavilhão, mas recolhidas em tempos diferentes). No final da recolha, as amostras foram colocadas em condições microaerofílicas (CampyGen, ThermoScientific) e transportadas com a maior brevidade, numa mala isotérmica, para o laboratório. A temperatura de transporte foi mantida entre 8 - 12°C, sendo o período máximo de processamento de amostras de 2h30.

#### 2. Cultura e isolamento

No laboratório, sob condições assépticas, foi realizado um corte no fundo dos cecos para separação do seu conteúdo da parede (mucosa). A unidade de amostra consistiu no material proveniente do mesmo bando. O protocolo de isolamento realizado foi uma adaptação entre o descrito em ISSO 10272-1:2006 e por Borges (179).

Cada amostra era constituída por 10 g de **parede cecal** recolhida em cerca de 20 animais diferentes. Os segmentos de parede foram minuciosamente cortados em pequenos fragmentos das diferentes porções do ceco e, posteriormente, foram suspensos em 10 mL de *Bolton Broth* (*Bolton Broth* CM0983, Oxoid with 5% *Horse blood Lysed* SR0048C) e homogeneizados num *Stomacher*

durante 1 minuto e deixados a pré-enriquecer durante 1-2 horas a 37°C em atmosfera de microaerofilia (CampyGen, ThermoScientific). De seguida, 300 µl da suspensão foram diluídos em 900 µl de APT (*Buffered Peptone Water* 20g/L, Biokar), retirando-se 100 µl para uma membrana de celulose de 0,45 µm (*Membrane Filters white*, Whatman) colocada diretamente numa placa de CFA (*CampyFood Agar*, bioMérieux SA) e COS (*Columbia agar + 5% sheep blood*, bioMérieux SA). Realizaram-se também diluições em série com APT até à [-6] para inoculação de microgotas de 10 µl em placas de CFA. As placas foram depois incubadas durante 1-2 horas a 37° C também em condições microaerofílicas. Por fim, as membranas de celulose foram removidas cuidadosamente das placas, espalhado o filtrado, sendo novamente incubadas durante 44 ± 4 h a 41,5° C na mesma atmosfera.

Do **conteúdo cecal**, pesou-se cerca de 10 g provenientes de cerca de 20 animais diferentes. Foi homogeneizado com 90 mL de Bolton Broth num stomacher, durante 30 segundos, para um pré-enriquecimento durante 1-2 horas a 37°C em condições microaerofílicas. De seguida, realizou-se diluições em série com APT até [-6]. 100 µl da mistura da diluição [-3] foi inoculada numa membrana de celulose de 0,45 µm colocada diretamente numa placa de CFA e COS. Numa placa de CFA, foram inoculadas microgotas de 10 µl das diluições [-3] a [-6] para as contagens. As placas foram depois incubadas durante 1-2 horas a 37°C também em condições microaerofílicas. Por fim, foram removidas cuidadosamente as membranas de celulose das placas, espalhado o filtrado, sendo novamente incubadas durante 44 ± 4 h a 41,5°C em condições microaerofílicas.

Para os **fígados**, pesou-se 10 g para um saco estéril onde foi manualmente esmagado. Foi posteriormente homogeneizado em 10 mL de Bolton Broth para um pré-enriquecimento durante 1-2 horas a 37°C em condições microaerofílicas. Um total de 100 µl desta mistura foi inoculado numa membrana de celulose de 0,45 µm colocada diretamente numa placa de CFA e COS. Realizaram-se também diluições em série com APT até à [-2]. Numa placa de CFA, foram inoculadas microgotas de 10 µl das diferentes diluições até [-2] para as contagens, sendo ¼ usado para esgotamento de homogenizado inicial. As placas foram depois incubadas durante 1-2 horas a 37°C também em condições microaerofílicas. Por fim, as membranas de celulose foram removidas cuidadosamente das placas, espalhado o filtrado, sendo novamente incubadas durante 44 ± 4 h a 41,5°C em condições microaerofílicas.

### 3. *Análise Histopatológica*

Alguns dos cecos (incluindo cecos sobranes do isolamento) e fragmentos de fígados com lesões vibrionicas (fígado friável com lesões necróticas multifocais ou difusas, esbranquiçadas, salientes e em forma estrelada/asterisco) foram fixados em formalina 10% durante 24 horas e posteriormente transferidos para álcool a 70%. Os cecos foram seccionados transversalmente e longitudinalmente, enquanto dos fígados foram selecionados fragmentos com representação das lesões. As amostras foram processadas de rotina para inclusão em parafina e coloração com

hematoxilina-eosina (HE). Após a observação das preparações coradas com HE e, tendo em consideração os achados histológicos, foram feitas colorações histológicas especiais (Gram, Ziehl-Neelsen, Giemsa modificado) seguindo protocolos de rotina do laboratório.

#### 4. Identificação fenotípica e testes bioquímicos

Duas colônias de cada tipo morfológico foram escolhidas para realização de esfregaço a fresco (avaliação de morfologia espiralada e movimento de saca-rolhas), teste de oxidase (Oxidase Test Stick, Liofilchem) e coloração de Gram. As colônias compatíveis com classificação CLO, foram sub-cultivadas em duas placas TSA + 5% Sangue lisado de cavalo (Trypto-casein soy agar, Biokar diagnostics + Horse blood Lysed SR0048C, ThermoScientific) e foi feita nova incubação a 42°C durante 48 horas para teste de confirmação de crescimento em atmosfera aerofílica e microaerofílica (CampyGen, ThermoScientific).

#### 5. Identificação por PCR

Para a **identificação direta** das espécies bacterianas presentes, foi realizada a extração de DNA a partir de 2 g de parede cecal com a utilização de um kit comercial de fezes (QIAamp cador Pathogen Mini Kit (50), QIAGEN) (9), como recomendado pelo fabricante.

A extração de DNA a partir de suspensão de **células bacterianas** foi realizada por tratamento térmico (15 min a 95°C) em 20 µl de tampão TE (Tris 10mM e EDTA 1mM com pH=8). Posteriormente adicionou-se 180 µL de H<sub>2</sub>O UP estéril, fez-se centrifugação a 12000 rpm durante 3 min e de seguida descartou-se o sedimento e preservou-se o sobrenadante contendo o DNA a -20°C.

Foi efetuada a identificação molecular com o PCR Multiplex *Campylobacter* (que deteta *Campylobacter* spp., *C. hyointestinalis*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. lari*, *C. jejuni* e *C. upsaliensis*) (247) e PCR de *H. pullorum* (171), ambos para o gene RNAr 16S. As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 25 µL com os seguintes reagentes: 0,4 µL Taq polimerase a 4 UI (DFS-Taq DNA Pol, 5units/ul, Bioron), 2,5 µL Complete buffer (Complete 10x Reac. Buffer, Bioron), 0,5 µL de dNTPs a 10 mM (4you4 dNTP Mix), 0,5 µL de cada primer a 0,5 µM (7 pares) para o PCR Multiplex *Campylobacter* ou 1 µL de cada primer a 0,5 µM (1 par) de *H. pullorum*, 5 µL de DNA da amostra, totalizando-se o volume até 25 µL com Dnase-free water (Water for Molecular Biolgy, nzytech). Os ciclos de temperatura para o PCR Multiplex *Campylobacter* consistiram em: 15 min a 95°C, 30 seg a 95°C, 90 seg a 58°C, 1 min a 72°C (em 25 ciclos), seguidos de 7 min a 72°C; para o PCR *H. pullorum*: 3 min a 95°C, 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C (em 35 ciclos) seguido de 10 min a 72°C. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Agarose Ultrapure grade, nzytech) durante 60 a 90min a 100 Volts, usando o tampão TBE e 1% de GreenSafe (GreenSafe Premium, nzytech). Utilizou-se o marcador molecular de DNA (NZYDNA Ladder VII, nzytech).

Adicionalmente, para os isolados de *C. jejuni* e *C. coli*, realizou-se ainda o PCR para uma das regiões variáveis do gene *flaA* que codifica para a sub-unidade A do flagelo de *Campylobacter* (248). As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 12,5 µL com os seguintes reagentes: 0,2 µL Bio-X-Act Short DNA Pol (Bioline), 1,25 µL 10x OptiBuffer (Bioline), 2,5 µL de dNTPs a 800 µM (Invitrogen), 0,625 µL de cada primer a 10 µM (1 par) de PCR *flaA*, 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50mM (Bioline), 4,1 µL com Dnase-free water (Invitrogen) e 2,5 µL de DNA. Os ciclos de temperatura consistiram em: 5 min a 94°C, 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 30 seg a 72°C (em 35 ciclos), seguido de 10 min a 72°C. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% (SeaKem® LE Agarose) durante 30 min a 100 Volts, usando o tampão TBE e 1% de green safe (GreenSafe Premium, nzytech). Utilizou-se o mesmo marcador molecular descrito anteriormente. Antes de serem sequenciados, os produtos de PCR foram tratados com ExoSAP-IT (USB Corporation) de acordo com instruções do fabricante. A reação de sequenciação capilar foi realizada com *BigDye terminator Reaction* no sequenciados ABI 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). As sequências nucleotídicas foram analisadas com DNASTAR Lasergene® e comparadas com a base de dados de FlaA (<http://pubmlst.org/campylobacter>), identificando-se o número de alelo.

Para as estirpes de *H. pullorum*, realizou-se também o PCR para detecção do gene *hpc* (*hemolysin coagulated protein*), marcador do T6SS. Foram utilizados os primers Hpullo\_hpcF1 (5'-CTAGTGGAGGCAAGAACAX-3') e Hpullo\_hpcR1 (5'-ATCATCGCTTCCGCTTGTTTC-3') desenhados no laboratório do INSA. A reação de amplificação foi realizada em volume final de 12,5 µL com os seguintes reagentes: 0,2 µL Bio-X-Act Short DNA Pol (Bioline), 1,25 µL 10x OptiBuffer X (Bioline), 2,5 µL de dNTPs a 800 µM (Invitrogen), 0,625 µL de cada primer a 10 µM (1 par), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub> a 50mM (Bioline), 4,1 µL de água Dnase-free (Invitrogen) e 2,5 µL de DNA. Os ciclos de temperatura utilizados na amplificação foram 5 min a 95°C, 30 seg a 94°C, 1 min a 52°C, 20 seg a 72°C (em 40 ciclos) e 10 min a 72°C. Após realização de PCR, os produtos amplificados (de 188 pb) foram submetidos a eletroforese em gel, como descrito anteriormente.

## 6. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

O TSA foi realizado por difusão em disco (Oxoid) aos seguintes antibióticos: eritromicina (15 µg), tetraciclina (30µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), amoxicilina e ácido clavulânico (20/10 µg), ertapenem (10 µg) e ampicilina (10 µg). Nalguns isolados fez-se a determinação da CMI por gradiente de difusão, com tiras Etest (bioMérieux). Para as culturas foram usadas suspensões bacterianas, em soro fisiológico, de 0,5 McFarland (para *Campylobacter* spp.) e 3 McFarland (para *H. pullorum*). O meio usado foi agar de Mueller-Hinton suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado (Oxoid) e com 20 mg/L β-Nicotinamide adenine dinucleotide (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas em atmosfera microaerófila enriquecido com 5% de hidrogénio, obtida por sistema Anoxomat™ (MART Microbiology, BV), durante 24h a 48h a 42°C, para *Campylobacter* e *H. pullorum*, respetivamente. A classificação entre sensível e resistente foi baseada nos *cut-offs* descritos em



EUCAST ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)) ou CASFM (chrome-extension://oemmndcbldboiebfnladdacbdmfmadm/http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFMV1\_0\_MARS\_2017.pdf).

## 7. Whole Genome Sequencing (WGS)

Foi realizada a sequenciação de genoma total (WGS) para alguns isolados de *C. coli* que apresentaram alto nível de resistência ao ertapenemo. Foi utilizado o kit Nextera XT DNA Sample Preparation 114 Kit no aparelho *MiSeq* (Illumina Inc.) de acordo com o protocolo descrito em Borges (179). O *assembly* dos genomas foi feito com recurso ao *software* INNUCA (<http://www.innuendoweb.org/news-and-events/innuca-oursoftwarepipelineforautomaticqaqcmeasuresoffastqreads>), seguido de anotação no RAST (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>). A filogenia foi avaliada pelo método de *Maximum Likelihood*, através do *software* MEGA (249). A análise de variações nucleotídicas (*Single nucleotide polymorphism* - SNP) foi realizada com o *software* SNIPPY (<https://github.com/tseemann/snippy>). Para identificação de determinantes de resistência foram utilizados os *softwares* RESFINDER (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) e CARD (<https://card.mcmaster.ca/>).

## V. RESULTADOS

### 1. Cultura e Isolamento

Na otimização do protocolo (dados não apresentados), foram identificadas algumas dificuldades e implementadas melhorias: (i) colocar na estufa as placas após inoculação no filtro (necessidade de temperatura para as bactérias passarem pelo filtro); (ii) recomendação de colocação de apenas 100 µl da solução no filtro, sob risco de extravasamento e contaminação da placa (exceto em soluções espessas como o soro inativado de equino); (iii) melhores resultados no uso de filtros com poro de 0,65 µm comparativamente aos de 0,45 µm, apesar de ambos impedirem a contaminação; (iv) crescimento de *H. pullorum* no meio CFA, apesar de parcialmente inibidas (menos UFC) e de serem mais difíceis de subcultivar; (v) o meio de CFA reduz consideravelmente a contaminação bacteriana, não sendo contudo 100% eficaz; (vi) *Campylobacter* spp. é notavelmente mais aerotolerante que *H. pullorum*; (vii) não crescimento em meios sem sangue/plasma sanguíneo (válido principalmente para *H. pullorum*); (viii) o enriquecimento de 24 ou 48 horas antes da cultura, aumenta consideravelmente o risco de contaminação bacteriana, principalmente com *Proteus* spp. e (ix) sempre que se identificou as espécies CLO num protocolo de enriquecimento de 24 ou 48 horas antes da cultura, também foram sempre identificadas com uma cultura direta sem enriquecimento.

Dentro do género *Campylobacter* não se verificou relação entre a morfologia das colónias e espécie. Por sua vez, *H. pullorum* forma colónias de tamanho muito menor que *Campylobacter* e cor mais acinzentada (em meio COS ou TSA + 5% Sangue lisado de cavalo). Durante a cultura, verificou-se que algumas colónias pareciam ser mais aderentes ao agar e pareciam provocar hemólise no meio

com sangue. Nas placas de CFA as colónias de *H. pullorum* apresentavam-se de muito menor tamanho, com centro mais encarnado e reduzidos filamentos.

Por observação microscópica a fresco (dados não apresentados), verificou-se diferença ao nível do movimento celular entre os géneros em estudo: *H. pullorum* demonstrou um movimento notavelmente mais lento que *Campylobacter* e em cambalhota; quanto ao tamanho das células, *C. coli* aparenta ser de maiores dimensões; em culturas mais envelhecidas ou em stress, é frequente a observação de formas cocóides em *Campylobacter* spp., mas não em *H. pullorum*.

Não foi observada correlação entre a contagem na Parede Cecal e o Conteúdo Cecal (Figura 2). Contudo, a deteção de *H. pullorum* foi superior nas amostras provenientes da Parede Cecal.

O PCR de deteção direta parece ser uma ferramenta sensível e específica nomeadamente de *H. pullorum*, o que reduz consideravelmente o tempo necessário para se ter um resultado, comparativamente com o isolamento por cultura. Contudo, não é 100% sensível.

## 2. Caraterização das explorações

Os dados relativos à produção foram compilados para análise. Dada a variedade e promiscuidade de morfologias de colónias entre as espécies, os resultados das contagens apresentam-se como CLO, que inclui as três espécies aqui já referidas.

## 3. Prevalência nas explorações

Os resultados relativos à frequência de deteção de *Campylobacter* spp. e *H. pullorum* na totalidade das 18 explorações provindas das 26 amostras de Parede Cecal e Conteúdo Cecal analisados por cultura e/ou PCR encontram-se resumidos na seguinte Tabela 5:

**Tabela 5.** Frequências das espécies bacterianas estudadas nas 18 explorações amostradas.

Negativo	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i> + <i>C. jejuni</i>	<i>H. pullorum</i> + <i>C. coli</i>	<i>H. pullorum</i> + <i>C. jejuni</i>	<i>H. pullorum</i> + <i>C. coli</i> + <i>C. jejuni</i>	<i>H. pullorum</i>
2 (11,1%)	1 (5,6%)	1 (5,6%)	1 (5,6%)	2 (11,1%)	1 (5,6%)	8 (44,4%)	2 (11,1%)
<b><i>Campylobacter</i> spp.</b> 14 (77,8%)							
				<b><i>H. pullorum</i></b> 13 (72,2%)			

No geral, 77,8% das explorações estão contaminadas com *Campylobacter* spp., sendo a prevalência de *H. pullorum* ligeiramente inferior (72,2%). Não existe diferença no predomínio das espécies do género *Campylobacter* spp. (66,7% com *C. coli* e 61,1% com *C. jejuni*); 61,1% das explorações apresentaram co-colonização de *Campylobacter* spp. e *H. pullorum*.

Relativamente às oito amostras de fígados com lesões compatíveis com hepatite vibriónica, obtiveram-se contagens na ordem de  $10^2$  e  $10^3$  UFC/g, substancialmente inferiores às contagens obtidas nos cecos do mesmo bando, tendo-se encontrado as 3 espécies CLO estudadas, com

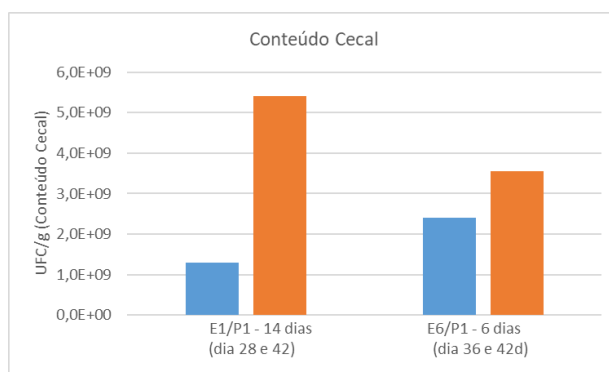
predomínio de *C. coli*. Dois dos fígados com lesões não obtiveram cultura positiva, contrastando com os resultados dos cecos.

Também se amostrou um fígado sem lesões aparentes (F14) e um baço (B1), tendo-se obtido resultados igualmente positivos da mesma grandeza, com detecção de *C. coli* e *C. jejuni* respetivamente.

#### 4. Relação entre a prevalência e os parâmetros das explorações

Com base nos resultados obtidos (Figura 2), não parece haver associação entre as variáveis produtivas quantitativas e a contagem de CLO, nomeadamente a dimensão do bando (número de aves) ou exploração, duração do vazio sanitário (dias), idade (dias), mortalidade acumulada (%), rejeições no matadouro (%), tempo entre o primeiro desbaste na exploração e no pavilhão e a recolha da amostra (dias), peso de abate, desinfetante usado e dias após última administração de antibiótico. Contudo, dois bandos foram amostrados em duas etapas de criação diferentes, sendo notório o aumento das contagens com a idade (Figura 1).

**Figura 1.** Variação das contagens de CLO em duas idades diferentes dos pintos, em duas explorações distintas.



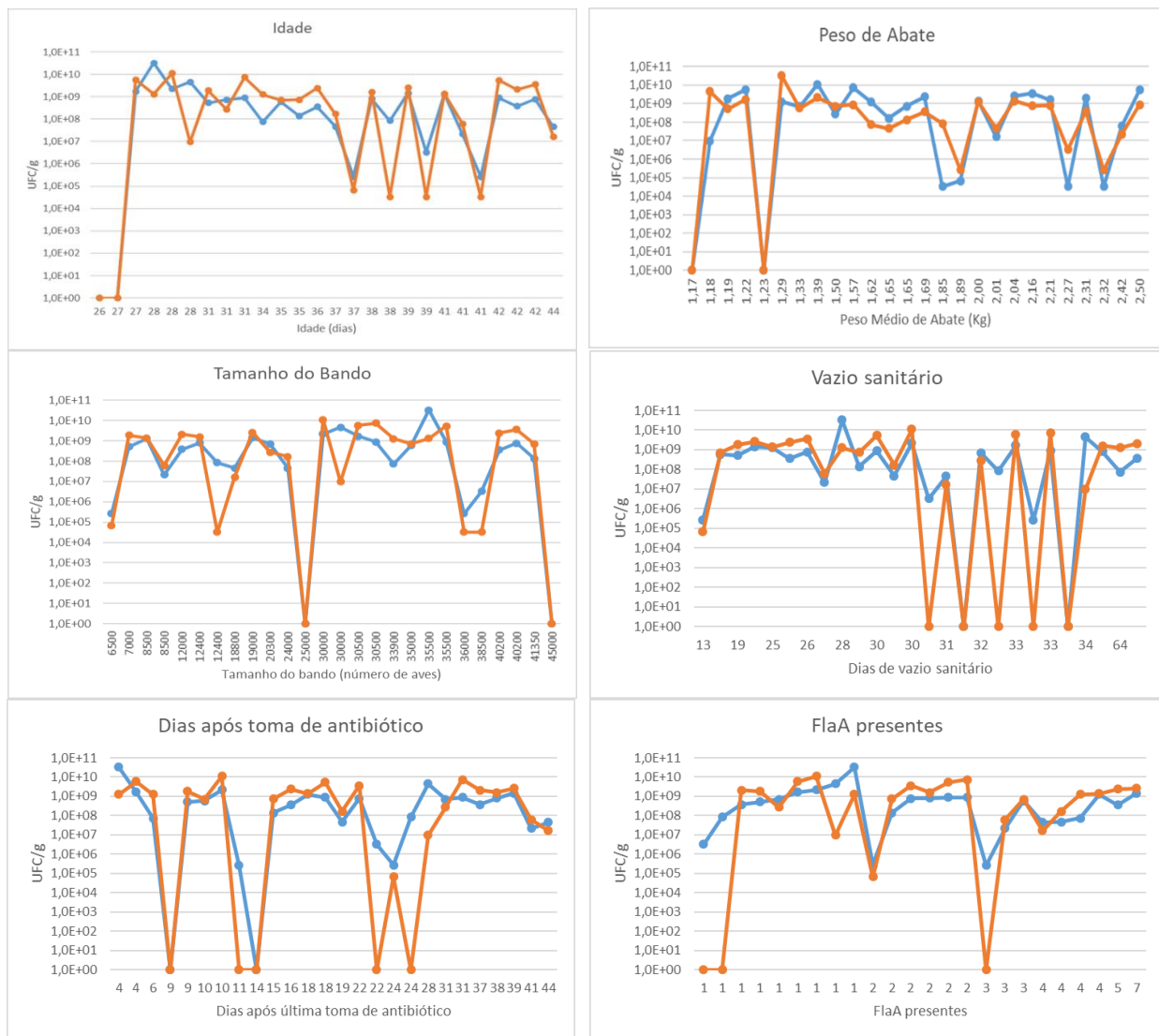
Inquiridos os técnicos responsáveis pelo acompanhamento de explorações e realizadas as visitas a explorações, concluiu-se que as explorações que apresentam resultados negativos apresentam cuidados de biossegurança mais desenvolvidos, nomeadamente as explorações E5, E8 e E17.

#### 5. Análise Histopatológica

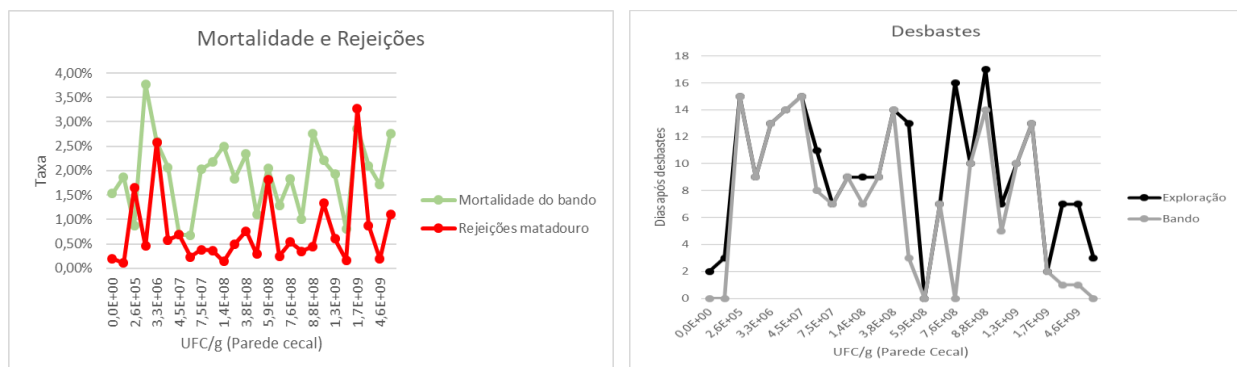
Os cecos apresentam-se fortemente parasitados por coccídeas (morfologicamente compatíveis com *Eimeria*) sob a forma de oocistos e, menos frequentemente com esquizontes com merozoítos. Estas formas parasitárias surgiam livres no lúmen intestinal, em posição intra-epitelial (epitélio de superfície e criptas) e ocasionalmente invadiam a submucosa. Em todos os cecos, observaram-se criptas com acumulação de detritos necróticos e de células inflamatórias, nomeadamente granulócitos, mas sem alteração da arquitetura das criptas (abscessos crípticos).

Estes achados foram também encontrados em cecos com resultados microbiológicos negativos, ainda que o número de abscessos das criptas parecia maior em casos com isolamento positivo. Em alguns casos, observava-se inflamação difusa a focal da mucosa do ceco com infiltrado misto constituído por granulócitos, macrófagos, linfócitos e, por vezes associada a áreas de hemorragia.

**Figura 2.** Variação das contagens de CLO nas diferentes variáveis da exploração.



**Legenda:** azul – Contagens na Parede Cecal; Laranja – Contagens no Conteúdo Cecal.



Nos fígados verificou-se a presença de múltiplos focos de necrose rodeados de inflamação mista com predomínio de macrófagos, incluindo células gigantes, menor número de granulócitos e mais ocasionalmente linfócitos. Em alguns focos existia uma camada mais externa de tecido de granulação. Era frequente a confluência entre os granulomas.

Nas colorações de Gram, Giemsa modificada e Ziehl-neelsen não se observaram bactérias, a nível das lesões necróticas dos fígados. Nos abscessos das criptas do ceco também não se observaram no Giemsa modificado bactérias com morfologia em espiroquetas

## 6. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Dos isolados obtidos por cultura das amostras, procedeu-se à escolha de 2 a 4 isolados de cada espécie de cada amostra para TSA.

**Tabela 8.** Taxas de resistência aos antibióticos dos isolados estudados (n=140).

	Eritromicina n (%)	Tetraciclina n (%)	Ciprofloxacina n (%)	Gentamicina n (%)	Amox. Ac. Cláv. n (%)	Ertapenemo* n (%)	Ampicilina n (%)
<i>C. coli</i> (n=74)	59 (79,7%)	72 (97,3%)	74 (100,0%)	5 (6,8%)	0 (0,0%)	8 (10,8%)	64 (86,5%)
<i>C. jejuni</i> (n=55)	0 (0,0%)	54 (98,2%)	55 (100,0%)	2 (3,6%)	0 (0,0%)	4 (7,3%)	40 (72,7%)
<i>H. pullorum</i> (n=11)**	5 (45,5%)	3 (27,3%)	11 (100,0%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)	6 (54,5%)	6 (54,5%)
<b>Total</b> (n=140)	64 (45,7%)	129 (92,1%)	140 (100%)	7 (5%)	1 (0,7%)	18 (12,9%)	110 (78,6%)

\*os isolados com halo de inibição < 21 mm foram testados para determinação de CMI;

\*\*halos de inibição < a 20 mm foram testados para determinação de CMI, e a classificação em resistente foi inferida da literatura.

No geral, para *Campylobacter* foi observada uma alta frequência de estirpes resistentes à ciprofloxacina, tetraciclina e ampicilina. Em relação à eritromicina, de destacar a elevada taxa de resistência em *C. coli* (79,7%), não tendo sido detetada em *C. jejuni*. *H. pullorum* também apresentou alta frequência de resistência a vários dos antibióticos testados. Para além destas resistências mais convencionais, detetou-se resistência à gentamicina em *C. coli* (6,8%) e *C. jejuni* (3,6%), não tendo sido detetada em *H. pullorum*. Outra resistência encontrada de grande relevância foi ao ertapenemo, observada em *C. coli* (10,8%), *C. jejuni* (7,3%) e *H. pullorum* (54,5%).

Relativamente à MDR, 90,5% dos *C. coli* são MDR (com 12,2% resistentes a 3 antibióticos diferentes, 63,5% a 4 e 14,9% a 5 antibióticos diferentes). Em *C. jejuni*, 72,7% são MDR (com 61,8% resistente a 3 antibióticos diferentes e 10,9% a 4 antibióticos diferentes). Em *H. pullorum*, 81,8% são MDR (com 63,6% resistente a 3 antibióticos diferentes e 18,2% a 4 antibióticos diferentes).

Nos isolados provenientes de fígados, não existe diferença nos TSA comparativamente aos isolados com o mesmo genótipo *flaA* provenientes do ceco.

Não existe correlação entre os perfis de resistência dos isolados e os técnicos de acompanhamento de cada exploração.

Perante os resultados da difusão em disco, e para se ter uma ideia do nível de resistência (alto ou baixo), selecionaram-se grupos de isolados, para os quais foram determinadas as CMI, por gradiente de difusão por E-test, nomeadamente em casos de resistência ou baixa suscetibilidade:

- 5 isolados de *H. pullorum* – Quando resistentes a eritromicina, ciprofloxacina e ertapenem, obtiveram-se CMIs >32 mg/L;
- 16 isolados de *C. coli* – Apesar de não resistentes, vários isolados apresentaram CMIs com resultados intermédios de 6 e 8 mg/L à amoxicilina e ac. clavulâmico, estando associados maioritariamente ao genótipo *flaA* 66. As CMIs do ertapenem foram muito variáveis, desde alto nível de resistência (CMI >32 mg/L), para os isolados do genótipo *flaA* 66 e 16, até CMIs entre 1-4 mg/L.
- 6 isolados de *C. jejuni* – As CMIs para ertapenem foram <3 mg/L.

## 7. Genótipo *flaA*

Os mesmos isolados de *Campylobacter* spp. para os quais se realizou o TSA, foram também caracterizados quanto ao genótipo *flaA*.

Para o mesmo bando, foi obtido o mesmo genótipo *flaA* nos isolados do ceco e do fígado. Relativamente à distribuição dos genótipos *flaA* pelas explorações, como indicado na tabela 9, os *flaA* mais amplamente distribuídos são o *flaA*-425 em *C. coli* e *flaA*-287 em *C. jejuni*, ambos presentes respetivamente em 5 e 8 explorações diferentes. Relativamente a variabilidade na mesma exploração, parece variar entre 1 a 9 genótipos diferentes. É ainda observável que nos dois bandos que foram amostrados em duas etapas de criação diferentes, ocorre um acréscimo no número de estirpes detetadas nos isolados provenientes dos animais com mais idade. Contudo, não existe correlação entre as contagens cecais e número de estirpes identificadas.

Não existe correlação entre os *flaA* dos isolados e os técnicos de acompanhamento de cada exploração.

## 8. T6SS em *H. pullorum*

Procedeu-se à avaliação da frequência de T6SS em 11 isolados de *H. pullorum*. A deteção do gene *hcp* (marcador do T6SS) por PCR foi positiva em 4 (36,4%). Observou-se uma correlação entre a presença deste gene e o perfil de resistência aos antibióticos (Tabela 9), sendo sobretudo a resistência à ampicilina observada na estirpes negativas para o T6SS que difere nos 2 grupos de isolados.

**Tabela 9.** Diagrama de distribuição dos isolados pelas explorações (TSA, *FlaA* e T6SS). As explorações referidas com “(A)”, são isolados estudados relativos ao bando anterior (contagens não apresentadas no estudo).

		Exposições																												Resistência								
		E1A/P3	E1/P1	E2	E3	E4A	E4	E5/P1	E5/P4A	E5/P4	E7/P2	E7/P3	E9	E10/P1	E10/P3	E11	E12A/P3	E12/P2	E12/P4	E12/P5	E12/P5A	E12/P6	E13	E14	E15	E16	E17	E18	T. Expl	Entro	Tetra	Cipro	Genta	Am/Ca	Era	Amp	T. Isola	
Estirpes	C.coli	13									X																		1	50,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	2	
		16																											2	50,0%	100,0%	100,0%	75,0%	0,0%	25,0%	0,0%	4	
		17																											1	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	4	
		18																																		4		
		23	X																										2	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	2	
		30																											3	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	20,0%	5	
		34																											1	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	10	
		66																											2	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	5	
		96																											1	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	1	
		164																											1	0,0%	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	1	
		200																											1	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	1	
		425																											8	100,0%	100,0%	100,0%	3,6%	0,0%	0,0%	100,0%	28	
		582																											1	33,3%	33,3%	100,0%	0,0%	0,0%	33,3%	100,0%	3	
		871																											1	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	1	
		907																											1	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	1	
		1227																											3	33,3%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	33,3%	100,0%	3	
	C.jejuni	11																											2	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	2	
		14																											1	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	1	
		16																											3	0,0%	100,0%	100,0%	11,1%	0,0%	0,0%	100,0%	9	
18																												1	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	3		
34																												4	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	8		
49																												1	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	1		
60																												1	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	1		
164																												1	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	2		
287		X																										8	0,0%	4,8%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	28,0%	21		
350																												1	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	2		
980																											2	0,0%	100,0%	100,0%	0,0%	0,0%	80,0%	100,0%	5			
T655																											4	100,0%	75,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	4			
H. pul	Ndo																										4	14,3%	0,0%	100,0%	0,0%	14,3%	71,4%	85,7%	7			
TOTAL Estirpes		2	2	3	4	1	4	5	2	2	7	1	1	3	2	1	1	1	2	1	1	1	4	2	3	1	1	4										
Eritromicina		0,0%	87,5%	20,0%	28,6%	100,0%	11,1%	56,3%	33,3%	0,0%	20,0%	0,0%	0,0%	80,0%	66,7%	100,0%	0,0%	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	100,0%	25,0%	50,0%	33,3%	100,0%	100,0%	14,3%										
Tetraciclina		100,0%	100,0%	100,0%	85,7%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	90,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	66,6%	100,0%	50,0%	50,0%	100,0%	100,0%	85,7%										
Ciprofloxacina		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%										
Gentamicina		0,0%	12,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	60,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%										
Amoxiciclina/Act		0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	8,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%										
Ertapenem		0,0%	0,0%	20,0%	0,0%	0,0%	0,0%	12,5%	33,3%	0,0%	10,0%	100,0%	0,0%	20,0%	66,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	41,7%	50,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%									
Ampiciclina		50,0%	100,0%	100,0%	42,9%	100,0%	44,4%	100,0%	100,0%	100,0%	80,0%	100,0%	0,0%	100,0%	66,7%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	41,7%	50,0%	0,0%	0,0%	0,0%	85,7%								
TOTAL Isolados		2	8	5	7	2	9	16	3	4	10	4	3	5	6	4	3	6	5	4	3	4	12	2	3	1	1	7										

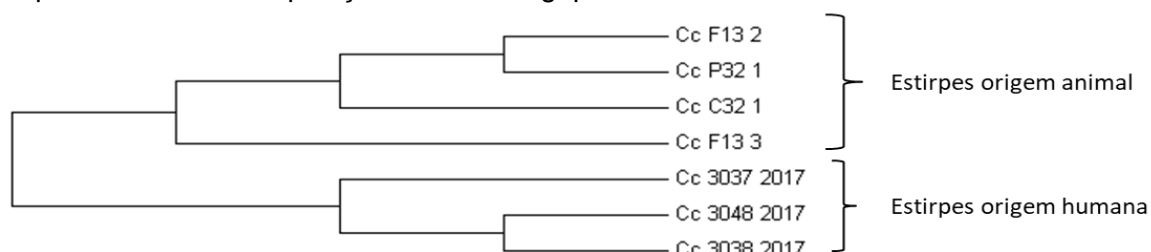
## 9. WGS

Os genomas de 4 estirpes MDR de *C. coli*, de 2 explorações diferentes, isolados em Nov. de 2017, foram estudados por WGS e comparados com 2 estirpes de *C. coli* isoladas de humanos, também em Nov. 2017, com o mesmo perfil de MDR. Os resultados encontram-se resumidos na Tabela 10. No geral, observou-se uma elevada proximidade entre as 4 estirpes de origem animal, que apresentaram um máximo de 8 polimorfismos de nucleótido único (SNPs) entre si, o que sugere que constituem o mesmo clone (quando comparadas com uma estirpe de *C. coli* não relacionada, a diferença foi de 7226 SNPs). Quando comparadas com as 2 estirpes de origem humana, a média foi de 616 SNPs, o que demonstra a elevada proximidade entre elas. A análise filogenética corrobora os dados anteriores, mas mostra que em termos evolutivos, as estirpes de origem animal e de origem humana formam *clusters* separados (Figura 3).

**Tabela 10.** Resumo dos resultados de WGS.

Estirpe	Origem	data de isolamento	MLST_ Sequence Type	Complexo clonal	genótipo flaA	tamanho genoma em bp	%GC	Plasmídeo	Profago	nº de SNPs X 3038	Determinantes de Resistência		
											eritromicina (mutação no RNAr 23S)	ciprofloxacina (substituição Gyrase A)	tetraciclina (presença do gene)
Cc-C32-1_S50_L001	Animal		860	828	66	1698844	31,4	~28 Kb	35.3 Kb	617	A2075G	Thr86Ile	tetO
Cc-P32-1_S49_L001	Animal		860	828	66	1707511	31,4	~28 Kb	35.3 Kb	619	A2075G	Thr86Ile	tetO
Cc-F13-2_S54_L001	Animal		860	828	66	1666612	31,4	~28 Kb	35.3 Kb	619	A2075G	Thr86Ile	tetO
Cc-F13-3_S53_L001	Animal		860	828	66	1665118	31,4	~28 Kb	35.3 Kb	608	A2075G	Thr86Ile	tetO
Cc-3037-2017_S56_L001	Humana	15/11/2017	860	828	66	1677994	31,3	não	35.3 Kb	38	A2075G	Thr86Ile	tetO
Cc-3038-2017_S55_L001	Humana	18/11/2017	860	828	66	1683990	31,4	não	35.3 Kb	x	A2075G	Thr86Ile	tetO

**Figura 3.** Análise molecular genética (método Maximum Likelihood), obtida no MEGA7. Bootstrap de 1000 replicados. Todas as posições contendo gaps foram eliminadas.



Ainda a demonstrar a proximidade entre as estirpes, verificou-se que todas pertencem ao genótipo ST-860, do complexo clonal (CC)-828, e são todas do genótipo *flaA*-66. Todas possuem o mesmo prófago inserido no genoma de cerca de 35.3Kb, mas curiosamente todas as estirpes animais possuem o mesmo plasmídeo (~28 Kb), enquanto as estirpes humanas não possuem plasmídeo. Em relação aos determinantes de resistência conhecidos, para eritromicina, ciprofloxacina e tetraciclina, foram detetados em todas as estirpes, ao nível do cromossoma (Tabela 10). Relativamente aos mecanismos de resistência ao carbapenemo ertapenemo, são ainda desconhecidos em *Campylobacter* spp., sendo estes genomas um material inestimável para esse estudo, que deverá incidir na BE CmeABC e em proteínas da membrana externa.



## VI. DISCUSSÃO

É notória a disseminação de *Campylobacter* spp. e *H. pullorum* nas 18 explorações amostradas, com apenas 11% de explorações negativas (o que corresponde a 2 explorações), sendo ligeiramente mais elevada que a média europeia (70 a 75%). Contudo as contagens encontram-se na média europeia, de acordo com os dados da EFSA (53). Estas bactérias encontram-se em animais aparentemente saudáveis, inclusive em fígados sem lesões. Observou-se que em 69% das explorações positivas havia co-colonização dos bandos com *Campylobacter* e *H. pullorum*. É, contudo, necessário referir que uma atmosfera de enriquecimento com Hidrogénio poderia elevar a frequência de deteção de *H. pullorum* nas amostras (172, 173). Note-se que o estudo foi realizado no Outono, sendo considerado uma estação de prevalência mediana (54). No estudo realizado, apenas foram encontradas as espécies *C. jejuni* e *C. coli* do género *Campylobacter*, existindo uma leve predominância de *C. coli*, como referido na literatura (17-20). O estudo de *H. pullorum* é pouco explorado em Portugal, existindo um desconhecimento não só sobre as características laboratoriais de *H. pullorum* e o modo de colonização no animal, mas também sobre a sua libertação nas fezes e transmissão alimentar.

O número de **contagens** obtidas não parece ser influenciado por nenhum dos fatores de produção monitorizados neste estudo. Contudo, as amostras provenientes do mesmo bando em momentos de criação diferentes demonstram o aumento das contagens com a idade dos frangos, podendo isto dever-se à sua maior proliferação ou à colonização com novas estirpes. Não foi considerada a importância de outros fatores da produção primária considerados influentes na prevalência e nos níveis de excreção nas fezes já referidos noutros estudos anteriores (35, 42, 84-95). A elevada frequência de CLO nas amostras estudadas poderá ser devido ao facto de as amostras cecais terem sido colhidas no matadouro, pois estudos anteriores realizados pelo laboratório demonstraram que as contagens fecais no matadouro aumentam relativamente aos níveis da exploração, provavelmente devido a contaminação nas jaulas de transporte ou mesmo o stress vivenciado pelas aves durante a contenção. Foi possível verificar que as explorações com resultados negativos apresentam níveis de biossegurança altos.

Comparativamente aos resultados referidos relatório EFSA/ECDC de 2016 (53) (Tabela 1), as taxas de **resistências** encontram-se acima para todos os antibióticos testados, sendo particularmente alarmante a frequência de resistência aos macrólidos, tetraciclinas e frequência de MDR. Estas resistências podem ser resultado do uso indevido de antibióticos na produção. Até ao momento, não existe referência de *Campylobacter* spp. resistente ao ertapenemo, sendo de especial importância perceber como foi adquirida essa resistência em isolados de aves. Os dados de WGS e do fenótipo de resistência, incluindo resistência aos carbapenemos, mostram a presença do mesmo clone de *Campylobacter* em explorações diferentes. Considerando que esta classe de antibióticos é de uso exclusivo humano e hospitalar, a hipótese de transmissão de *Campylobacter* do homem à exploração

tem que ser considerada, bem como algumas práticas que possam ter contribuído para a partilha do mesmo clone entre as 2 explorações. O estudo genético suporta também a transmissão através dos alimentos de estirpes multirresistentes.

Pelo diagrama de distribuição dos genótipos pelas explorações (Tabela 9), pode-se observar que os genótipos **flaA** do bando anterior são sempre distintos dos do bando atual, o que sugere que, apesar do reduzido número de amostras estudadas, os resultados sugerem que os agentes não se mantêm de um bando para outro, havendo uma inserção das bactérias posteriores à entrada no pavilhão. É, portanto, importante investigar melhor os métodos de transmissão inter-explorações. As resistências mais problemáticas (ertapenemo e gentamicina), por serem relativos a antibióticos de uso humano, parecem ser uma resistência adquirida e não intrínseca ao genótipo, dado estarem presentes em diferentes genótipos *flaA* e não serem uniformes (exceto o caso do ertapenemo no genótipo *flaA* 66). A resistência à gentamicina está restrita a apenas 2 explorações enquanto para o ertapenemo parece haver uma maior distribuição.

A presença do marcador de virulência **T6SS**, presente em 36% dos isolados de *H. pullorum*, sugere a presença de estirpes com diferentes graus de virulência, e que possam apresentar vantagem competitiva sobre os microrganismos competidores e uma adaptação à perturbação ambiental, podendo ser esse o motivo de apresentar taxas de resistências menores.

Com a forte presença de *Eimeria*, é possível que a causa da inflamação e das lesões intestinais histológicas seja multifactorial, resultando quer do parasitismo, quer das infeções bacterianas (independentemente da espécie bacteriana). Contudo, as lesões dos fígados já foram descritas em aves como resultantes de infeções bacterianas e os abscessos das criptas são semelhantes às descritas para as colites por *Campylobacter* spp. em humanos (250). Para uma melhor caracterização do envolvimento das bactérias estudadas no desenvolvimento destas lesões, as colorações imunohistoquímicas específicas poderão ser úteis.

Em conclusão, este estudo constituiu um contributo para consolidar o conhecimento sobre a epidemiologia de *Campylobacter* spp. na produção de aves, bem como um bom ponto de partida para aumentar o interesse sobre *H. pullorum*, considerado um agente patogénico emergente. Em ambos os casos, é essencial aprofundar o conhecimento para se conseguir diminuir a entrada destes agentes nas explorações e, assim, diminuir o risco de contaminação na carcaça; também a elevada resistência a antimicrobianos reforça a importância de redução do seu uso desproporcionado. Uma revisão dos métodos e higiene do abate e manipulação das carcaças, bem como promover hábitos de preparação e manipulação dos alimentos ao nível dos consumidores, é essencial para poder reduzir todos os riscos associados a estes agentes patogénicos.

## Bibliografia

1. Schroeder CM, Zhao C, DebRoy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(2):576-81.
2. Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microb Drug Resist.* 2000;6(1):77-83.
3. Kumar S, Majid M, Kumar N, Tiwari SK, Semmler T, Devi S, et al. Genome Dynamics and Molecular Infection Epidemiology of Multidrug-Resistant *Helicobacter pullorum* Isolates Obtained from Broiler and Free-Range Chickens in India. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(1).
4. Atabay HI, Corry JE, On SL. Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum*. *J Appl Microbiol.* 1998;84(6):1017-24.
5. Zaroni RG, Rossi M, Giacomucci D, Sanguinetti V, Manfreda G. Occurrence and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pullorum* from broiler chickens and commercial laying hens in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2007;116(1):168-73.
6. Gonzalez A, Piqueres P, Moreno Y, Canigral I, Owen RJ, Hernandez J, et al. A novel real-time PCR assay for the detection of *Helicobacter pullorum*-like organisms in chicken products. *Int Microbiol.* 2008;11(3):203-8.
7. Aboutaleb N, Kuijper EJ, van Dissel JT. Emerging infectious colitis. Current opinion in gastroenterology. 2014;30(1):106-15.
8. Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, Weiner S, Rump JA, Deissler W, et al. Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis. *Scand J Infect Dis.* 1997;29(3):315-8.
9. Ceelen L, Decostere A, Verschraegen G, Ducatelle R, Haesebrouck F. Prevalence of *Helicobacter pullorum* among patients with gastrointestinal disease and clinically healthy persons. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2984-6.
10. Facciola A, Riso R, Avventuroso E, Visalli G, Delia SA, Lagana P. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. *Journal of preventive medicine and hygiene.* 2017;58(2):E79-e92.
11. Shah PM, Schafer V, Knothe H. Medical and veterinary use of antimicrobial agents: implications for public health. A clinician's view on antimicrobial resistance. *Vet Microbiol.* 1993;35(3-4):269-74.
12. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12.
13. EFSA/ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017. 2017;15(12):5077.

14. Wagenaar JA, French NP, Havelaar AH. Preventing *Campylobacter* at the source: why is it so difficult? *Clin Infect Dis*. 2013;57(11):1600-6.
15. Manfreda G, Parisi A, De Cesare A, Mion D, Piva S, Zanoni RG. Typing of *Campylobacter jejuni* Isolated from Turkey by Genotypic Methods, Antimicrobial Susceptibility, and Virulence Gene Patterns: A Retrospective Study. *Foodborne pathogens and disease*. 2016;13(2):93-100.
16. Narvaez-Bravo C, Taboada EN, Mutschall SK, Aslam M. Epidemiology of antimicrobial resistant *Campylobacter* spp. isolated from retail meats in Canada. *Int J Food Microbiol*. 2017;253:43-7.
17. Stella S, Soncini G, Ziino G, Panebianco A, Pedonese F, Nuvoloni R, et al. Prevalence and quantification of thermophilic *Campylobacter* spp. in Italian retail poultry meat: Analysis of influencing factors. *Food microbiology*. 2017;62:232-8.
18. Torralbo A, Borge C, Garcia-Bocanegra I, Meric G, Perea A, Carbonero A. Higher resistance of *Campylobacter coli* compared to *Campylobacter jejuni* at chicken slaughterhouse. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 2015;39:47-52.
19. Wieczorek K, Kania I, Osek J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry carcasses in Poland. *J Food Prot*. 2013;76(8):1451-5.
20. Pergola S, Franciosini MP, Comitini F, Ciani M, De Luca S, Bellucci S, et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance profiles of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from broiler chicken in farms and at time of slaughter in central Italy. *J Appl Microbiol*. 2017;122(5):1348-56.
21. Oh JY, Kwon YK, Wei B, Jang HK, Lim SK, Kim CH, et al. Epidemiological relationships of *Campylobacter jejuni* strains isolated from humans and chickens in South Korea. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*. 2017;55(1):13-20.
22. Ohishi T, Aoki K, Ishii Y, Usui M, Tamura Y, Kawanishi M, et al. Molecular epidemiological analysis of human- and chicken-derived isolates of *Campylobacter jejuni* in Japan using next-generation sequencing. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2017;23(3):165-72.
23. Szczepanska B, Andrzejewska M, Spica D, Klawe JJ. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):80.
24. Cha W, Mosci RE, Wengert SL, Venegas Vargas C, Rust SR, Bartlett PC, et al. Comparing the Genetic Diversity and Antimicrobial Resistance Profiles of *Campylobacter jejuni* Recovered from Cattle and Humans. *Front Microbiol*. 2017;8:818.
25. Thepault A, Meric G, Rivoal K, Pascoe B, Mageiros L, Touzain F, et al. Genome-Wide Identification of Host-Segregating Epidemiological Markers for Source Attribution in *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(7).

26. Fitzgerald C NI. *Campylobacter and Arcobacter*. Manual of Clinical Microbiology. 2011:885-99.
27. Man SM. The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2011;8(12):669-85.
28. Garenaux A, Jugiau F, Rama F, de Jonge R, Denis M, Federighi M, et al. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Current microbiology*. 2008;56(4):293-7.
29. Damborg P, Olsen KE, Moller Nielsen E, Guardabassi L. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1363-4.
30. Bae W, Kaya KN, Hancock DD, Call DR, Park YH, Besser TE. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* spp. from cattle farms in Washington State. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(1):169-74.
31. Thakur S, Gebreyes WA. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *J Food Prot*. 2005;68(11):2402-10.
32. Ternhag A, Torner A, Svensson A, Giesecke J, Ekdahl K. Mortality following *Campylobacter* infection: a registry-based linkage study. *BMC infectious diseases*. 2005;5:70.
33. Jones K. *Campylobacters in water, sewage and the environment*. Symposium series (Society for Applied Microbiology). 2001(30):68s-79s.
34. Newell DG, Shreeve JE, Toszeghy M, Domingue G, Bull S, Humphrey T, et al. Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(6):2636-40.
35. Newell DG, Fearnley C. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(8):4343-51.
36. Inglis GD, Kalischuk LD, Busz HW. Chronic shedding of *Campylobacter* species in beef cattle. *J Appl Microbiol*. 2004;97(2):410-20.
37. Stafford RJ, Schluter PJ, Wilson AJ, Kirk MD, Hall G, Unicomb L. Population-attributable risk estimates for risk factors associated with *Campylobacter* infection, australia. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(6):895-901.
38. Meldrum RJ, Griffiths JK, Smith RM, Evans MR. The seasonality of human *campylobacter* infection and *Campylobacter* isolates from fresh, retail chicken in Wales. *Epidemiology and infection*. 2005;133(1):49-52.
39. Mullner P, Spencer SE, Wilson DJ, Jones G, Noble AD, Midwinter AC, et al. Assigning the source of human *campylobacteriosis* in New Zealand: a comparative genetic and epidemiological approach. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2009;9(6):1311-9.
40. Nachamkin I SM, Blaser JM. *Campylobacter*. 2008;3rd edition(Washington DC).

41. Mughini Gras L, Smid JH, Wagenaar JA, de Boer AG, Havelaar AH, Friesema IH, et al. Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental origin: a combined case-control and source attribution analysis. *PLoS One*. 2012;7(8):e42599.
42. Bull SA, Allen VM, Domingue G, Jorgensen F, Frost JA, Ure R, et al. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(1):645-52.
43. Verhoeff-Bakkenes L, Jansen HA, in 't Veld PH, Beumer RR, Zwietering MH, van Leusden FM. Consumption of raw vegetables and fruits: a risk factor for *Campylobacter* infections. *Int J Food Microbiol*. 2011;144(3):406-12.
44. Rapp D, Ross CM, Pleydell EJ, Muirhead RW. Differences in the fecal concentrations and genetic diversities of *Campylobacter jejuni* populations among individual cows in two dairy herds. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(21):7564-71.
45. Waldenstrom J, Axelsson-Olsson D, Olsen B, Hasselquist D, Griekspoor P, Jansson L, et al. *Campylobacter jejuni* colonization in wild birds: results from an infection experiment. *PLoS One*. 2010;5(2):e9082.
46. Nigel P. French AM, Barbara Holland, Julie Collins-Emerson, Rebecca Pattison, Frances Colles and Philip Carter<sup>4</sup> Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Isolates from Wild-Bird Fecal Material in Children's Playgrounds. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:779-83.
47. Tolve NS, Suggs JC, McCurdy T, Cohen Hubal EA, Moya J. Frequency of mouthing behavior in young children. *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology*. 2002;12(4):259-64.
48. Robinson DA. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British medical journal (Clinical research ed)*. 1981;282(6276):1584.
49. Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP, Blaser MJ. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J Infect Dis*. 1988;157(3):472-9.
50. Gibbons CL, Mangen MJ, Plass D, Havelaar AH, Brooke RJ, Kramarz P, et al. Measuring underreporting and under-ascertainment in infectious disease datasets: a comparison of methods. *BMC public health*. 2014;14:147.
51. Havelaar AH, Ivarsson S, Lofdahl M, Nauta MJ. Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiology and infection*. 2013;141(2):293-302.
52. Haagsma JA, Geenen PL, Ethelberg S, Fetsch A, Hansdotter F, Jansen A, et al. Community incidence of pathogen-specific gastroenteritis: reconstructing the surveillance pyramid for seven pathogens in seven European Union member states. *Epidemiology and infection*. 2013;141(8):1625-39.

53. EFSA/ECDC. The european union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. EFSA Journal 2012. 2012;10(3):1-207
54. Meunier M, Guyard-Nicodeme M, Dory D, Chemaly M. Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. J Appl Microbiol. 2016;120(5):1139-73.
55. Oberhelman RA, DN T. *Campylobacter* infections in developing countries. American Society for microbiology. 2000;*Campylobacter*(2nd edition):139-53.
56. Rao MR, Naficy AB, Savarino SJ, Abu-Elyazeed R, Wierzbza TF, Peruski LF, et al. Pathogenicity and convalescent excretion of *Campylobacter* in rural Egyptian children. American journal of epidemiology. 2001;154(2):166-73.
57. Bhadra RK, Lior H, Misra SK, Pal SC, Nair GB. Serotypes & biotypes of *Campylobacter jejuni* & *C. coli* from diverse sources in Calcutta. The Indian journal of medical research. 1989;89:225-8.
58. Havelaar AH, Haagsma JA, Mangen MJ, Kemmeren JM, Verhoef LP, Vijgen SM, et al. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. Int J Food Microbiol. 2012;156(3):231-8.
59. McGrogan A, Madle GC, Seaman HE, de Vries CS. The epidemiology of Guillain-Barre syndrome worldwide. A systematic literature review. Neuroepidemiology. 2009;32(2):150-63.
60. Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M, Morgan OW. Population incidence of Guillain-Barre syndrome: a systematic review and meta-analysis. Neuroepidemiology. 2011;36(2):123-33.
61. Zhang M, Li Q, He L, Meng F, Gu Y, Zheng M, et al. Association study between an outbreak of Guillain-Barre syndrome in Jilin, China, and preceding *Campylobacter jejuni* infection. Foodborne pathogens and disease. 2010;7(8):913-9.
62. Takahashi M, Koga M, Yokoyama K, Yuki N. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre and Fisher syndromes in Japan. J Clin Microbiol. 2005;43(1):335-9.
63. Poropatich KO, Walker CL, Black RE. Quantifying the association between *Campylobacter* infection and Guillain-Barre syndrome: a systematic review. Journal of health, population, and nutrition. 2010;28(6):545-52.
64. Baker MG, Kvalsvig, A., Zhang, J., Lake, R., Sears, A., & Wilson, N. Declining Guillain-Barré Syndrome after *Campylobacteriosis* Control, New Zealand, 1988–2010. Emerging Infectious Diseases. 2012;18(2):226-33.
65. Hannu T, Inman R, Granfors K, Leirisalo-Repo M. Reactive arthritis or post-infectious arthritis? Best practice & research Clinical rheumatology. 2006;20(3):419-33.
66. Townes JM, Deodhar AA, Laine ES, Smith K, Krug HE, Barkhuizen A, et al. Reactive arthritis following culture-confirmed infections with bacterial enteric pathogens in Minnesota and Oregon: a population-based study. Annals of the rheumatic diseases. 2008;67(12):1689-96.

67. Halvorson HA, Schlett CD, Riddle MS. Postinfectious irritable bowel syndrome--a meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(8):1894-9; quiz 942.
68. Thabane M, Kottachchi DT, Marshall JK. Systematic review and meta-analysis: The incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(4):535-44.
69. Keener K, Bashor MP, Curtis P, Sheldon B, Kathariou S. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2006;3(2):105 - 16.
70. Stas T, Jordan FT, Woldehiwet Z. Experimental infection of chickens with *Campylobacter jejuni*: strains differ in their capacity to colonize the intestine. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 1999;28(1):61-4.
71. Stern NJ, Hiett K, Cox N, Alfredsson GA, Kristinsson K, Line JE. Recent developments pertaining to *Campylobacter*. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 2000;39(2):183-7.
72. Petersen L, Nielsen EM, On SLW. Serotype and genotype diversity and hatchery transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial poultry flocks. *Veterinary Microbiology*. 2001;82(2):141-54.
73. van Gerwe T, Mifflin JK, Templeton JM, Bouma A, Wagenaar JA, Jacobs-Reitsma WF, et al. Quantifying transmission of *Campylobacter jejuni* in commercial broiler flocks. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(3):625-8.
74. N. J. Stern, N. A. Cox, Musgrove MT. Incidence and levels of *Campylobacter* in broiler after exposure to an inoculated seeder bird. *J Appl Res*. 2001;10:315-8.
75. Orhan Sahin NL, Shouxiong Huang and Qijing Zhang. Effect of *Campylobacter*-Specific Maternal Antibodies on *Campylobacter jejuni* Colonization in Young Chickens *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(9):5372-9
76. van Der Wielen PW, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BA, van Knapen F. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(6):2536-40.
77. Guerin MT, Sir C, Sargeant JM, Waddell L, O'Connor AM, Wills RW, et al. The change in prevalence of *Campylobacter* on chicken carcasses during processing: a systematic review. *Poult Sci*. 2010;89(5):1070-84.
78. Hayama Y, Yamamoto T, Kasuga F, Tsutsui T. Simulation model for *Campylobacter* cross-contamination during poultry processing at slaughterhouses. *Zoonoses and public health*. 2011;58(6):399-406.
79. Rosenquist H, Sommer HM, Nielsen NL, Christensen BB. The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*. *Int J Food Microbiol*. 2006;108(2):226-32.



80. Newell D, J W. Poultry infections and their control at the farm level. *Campylobacter*. 2000;2nd ed:497-510.
81. Callicott KA, Friethriksdottir V, Reiersen J, Lowman R, Bisailon JR, Gunnarsson E, et al. Lack of evidence for vertical transmission of *Campylobacter* spp. in chickens. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(9):5794-8.
82. El-Shibiny A, Connerton PL, Connerton IF. Enumeration and diversity of campylobacters and bacteriophages isolated during the rearing cycles of free-range and organic chickens. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(3):1259-66.
83. Cox NA, Richardson LJ, Maurer JJ, Berrang ME, Fedorka-Cray PJ, Buhr RJ, et al. Evidence for horizontal and vertical transmission in *Campylobacter* passage from hen to her progeny. *J Food Prot*. 2012;75(10):1896-902.
84. Gibbens JC, Pascoe SJ, Evans SJ, Davies RH, Sayers AR. A trial of biosecurity as a means to control *Campylobacter* infection of broiler chickens. *Preventive veterinary medicine*. 2001;48(2):85-99.
85. Newell DG, Elvers KT, Dopfer D, Hansson I, Jones P, James S, et al. Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(24):8605-14.
86. Hansson I, Vagsholm I, Svensson L, Olsson Engvall E. Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. *J Appl Microbiol*. 2007;103(3):640-9.
87. Guerin MT, Martin W, Reiersen J, Berke O, McEwen SA, Bisailon JR, et al. A farm-level study of risk factors associated with the colonization of broiler flocks with *Campylobacter* spp. in Iceland, 2001-2004. *Acta veterinaria Scandinavica*. 2007;49:18.
88. Shane SM, Montrose MS, Harrington KS. Transmission of *Campylobacter jejuni* by the housefly (*Musca domestica*). *Avian Dis*. 1985;29(2):384-91.
89. Hald B, Sommer HM, Skovgard H. Use of fly screens to reduce *Campylobacter* spp. introduction in broiler houses. *Emerg Infect Dis*. 2007;13(12):1951-3.
90. Huneau-Salaun A, Denis M, Balaine L, Salvat G. Risk factors for *Campylobacter* spp. colonization in French free-range broiler-chicken flocks at the end of the indoor rearing period. *Preventive veterinary medicine*. 2007;80(1):34-48.
91. Hue O, Le Bouquin S, Laisney MJ, Allain V, Lalande F, Petetin I, et al. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* spp. contamination of broiler chicken carcasses at the slaughterhouse. *Food microbiology*. 2010;27(8):992-9.
92. Allain V, Chemaly M, Laisney MJ, Rouxel S, Quesne S, Le Bouquin S. Prevalence of and risk factors for *Campylobacter* colonisation in broiler flocks at the end of the rearing period in France. *British poultry science*. 2014;55(4):452-9.

93. Bahrndorff S, Rangstrup-Christensen L, Nordentoft S, Hald B. Foodborne disease prevention and broiler chickens with reduced *Campylobacter* infection. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(3):425-30.
94. Ridley A, Morris V, Gittins J, Cawthraw S, Harris J, Edge S, et al. Potential sources of *Campylobacter* infection on chicken farms: contamination and control of broiler-harvesting equipment, vehicles and personnel. *J Appl Microbiol*. 2011;111(1):233-44.
95. Messens W, Herman L, De Zutter L, Heyndrickx M. Multiple typing for the epidemiological study of contamination of broilers with thermotolerant *Campylobacter*. *Vet Microbiol*. 2009;138(1-2):120-31.
96. Solis de los Santos F, Hume M, Venkitanarayanan K, Donoghue AM, Hanning I, Slavik MF, et al. Caprylic Acid reduces enteric *campylobacter* colonization in market-aged broiler chickens but does not appear to alter cecal microbial populations. *J Food Prot*. 2010;73(2):251-7.
97. Solis de Los Santos F, Donoghue AM, Venkitanarayanan K, Dirain ML, Reyes-Herrera I, Blore PJ, et al. Caprylic acid supplemented in feed reduces enteric *Campylobacter jejuni* colonization in ten-day-old broiler chickens. *Poult Sci*. 2008;87(4):800-4.
98. Metcalf JH, Donoghue AM, Venkitanarayanan K, Reyes-Herrera I, Aguiar VF, Blore PJ, et al. Water administration of the medium-chain fatty acid caprylic acid produced variable efficacy against enteric *Campylobacter* colonization in broilers. *Poult Sci*. 2011;90(2):494-7.
99. van Gerwe T, Bouma A, Klinkenberg D, Wagenaar JA, Jacobs-Reitsma WF, Stegeman A. Medium chain fatty acid feed supplementation reduces the probability of *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol*. 2010;143(2-4):314-8.
100. Skanseng B, Kaldhusdal M, Moen B, Gjevre AG, Johannessen GS, Sekelja M, et al. Prevention of intestinal *Campylobacter jejuni* colonization in broilers by combinations of in-feed organic acids. *J Appl Microbiol*. 2010;109(4):1265-73.
101. Byrd JA, Hargis BM, Caldwell DJ, Bailey RH, Herron KL, McReynolds JL, et al. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. *Poult Sci*. 2001;80(3):278-83.
102. van Bunnik BA, Katsma WE, Wagenaar JA, Jacobs-Reitsma WF, de Jong MC. Acidification of drinking water inhibits indirect transmission, but not direct transmission of *Campylobacter* between broilers. *Preventive veterinary medicine*. 2012;105(4):315-9.
103. Hilmarsson H, Thormar H, Thrainsson JH, Gunnarsson E, Dadadottir S. Effect of glycerol monocaprinate (monocaprin) on broiler chickens: an attempt at reducing intestinal *Campylobacter* infection. *Poult Sci*. 2006;85(4):588-92.
104. Gharib naseri K, Rahimi S, Khaki P. Comparison of the effect of probiotic, organic acid and medicinal plant on *Campylobacter jejuni* challenged broiler chickens. *J Agric Sci Technol*. 2012;14:1485-96.

105. Nishiyama K, Seto Y, Yoshioka K, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, et al. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. PLoS One. 2014;9(9):e108827.
106. Santini C, Baffoni L, Gaggia F, Granata M, Gasbarri R, Di Gioia D, et al. Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. Int J Food Microbiol. 2010;141 Suppl 1:S98-108.
107. Ghareeb K, Awad WA, Mohnl M, Porta R, Biarnes M, Bohm J, et al. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonization of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. Poult Sci. 2012;91(8):1825-32.
108. Willis WL, Reid L. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. Poult Sci. 2008;87(4):606-11.
109. Svetoch EA, Stern NJ. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry--A review. Poult Sci. 2010;89(8):1763-8.
110. Svetoch EA, Eruslanov BV, Levchuk VP, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, et al. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. Appl Environ Microbiol. 2011;77(8):2749-54.
111. Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, et al. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2008;52(3):1094-100.
112. Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Borzenkov VN, et al. Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. Journal of agricultural and food chemistry. 2008;56(6):1942-8.
113. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A, et al. Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol. 2005;71(11):6554-63.
114. El-Shibiny A, Scott A, Timms A, Metawea Y, Connerton P, Connerton I. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. J Food Prot. 2009;72(4):733-40.
115. Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM, Carlton RM. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol. 2005;109(3-4):275-83.
116. Carvalho CM, Gannon BW, Halfhide DE, Santos SB, Hayes CM, Roe JM, et al. The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. BMC Microbiol. 2010;10:232.
117. Fischer S, Kittler S, Klein G, Glunder G. Impact of a single phage and a phage cocktail application in broilers on reduction of *Campylobacter jejuni* and development of resistance. PLoS One. 2013;8(10):e78543.

118. Kittler S, Fischer S, Abdulmawjood A, Glunder G, Klein G. Effect of bacteriophage application on *Campylobacter jejuni* loads in commercial broiler flocks. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(23):7525-33.
119. Tsubokura K, Berndtson E, Bogstedt A, Kaijser B, Kim M, Ozeki M, et al. Oral administration of antibodies as prophylaxis and therapy in *Campylobacter jejuni*-infected chickens. *Clinical and experimental immunology*. 1997;108(3):451-5.
120. Hermans D, Van Steendam K, Verbrugghe E, Verlinden M, Martel A, Seliwiorstow T, et al. Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. *Veterinary research*. 2014;45:27.
121. Rice BE, Rollins DM, Mallinson ET, Carr L, Joseph SW. *Campylobacter jejuni* in broiler chickens: colonization and humoral immunity following oral vaccination and experimental infection. *Vaccine*. 1997;15(17-18):1922-32.
122. Widders PR, Thomas LM, Long KA, Tokhi MA, Panaccio M, Apos E. The specificity of antibody in chickens immunised to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. *Vet Microbiol*. 1998;64(1):39-50.
123. Noor SM, Husband AJ, Widders PR. In ovo oral vaccination with *Campylobacter jejuni* establishes early development of intestinal immunity in chickens. *British poultry science*. 1995;36(4):563-73.
124. Khoury CA, Meinersmann RJ. A genetic hybrid of the *Campylobacter jejuni* *flaA* gene with LT-B of *Escherichia coli* and assessment of the efficacy of the hybrid protein as an oral chicken vaccine. *Avian Dis*. 1995;39(4):812-20.
125. Neal-McKinney JM, Samuelson DR, Eucker TP, Nissen MS, Crespo R, Konkel ME. Reducing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry via vaccination. *PLoS One*. 2014;9(12):e114254.
126. Huang JL, Yin YX, Pan ZM, Zhang G, Zhu AP, Liu XF, et al. Intranasal immunization with chitosan/pCAGGS-*flaA* nanoparticles inhibits *Campylobacter jejuni* in a White Leghorn model. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010;2010.
127. Muller A, Thomas GH, Horler R, Brannigan JA, Blagova E, Levnikov VM, et al. An ATP-binding cassette-type cysteine transporter in *Campylobacter jejuni* inferred from the structure of an extracytoplasmic solute receptor protein. *Molecular microbiology*. 2005;57(1):143-55.
128. Buckley AM, Wang J, Hudson DL, Grant AJ, Jones MA, Maskell DJ, et al. Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine*. 2010;28(4):1094-105.
129. Annamalai T, Pina-Mimbela R, Kumar A, Binjawadagi B, Liu Z, Renukaradhya GJ, et al. Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. *Poult Sci*. 2013;92(8):2201-11.

130. Jagusztyn-Krynica EK, Wyszynska A, Raczko A. New approaches to development of mucosal vaccine against enteric bacterial pathogens; preventing campylobacteriosis. Polish journal of microbiology. 2004;53 Suppl:7-15.
131. Layton SL, Morgan MJ, Cole K, Kwon YM, Donoghue DJ, Hargis BM, et al. Evaluation of Salmonella-vectored Campylobacter peptide epitopes for reduction of Campylobacter jejuni in broiler chickens. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2011;18(3):449-54.
132. Theoret JR, Cooper KK, Zekarias B, Roland KL, Law BF, Curtiss R, 3rd, et al. The Campylobacter jejuni Dps homologue is important for in vitro biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2012;19(9):1426-31.
133. Berrang ME, Northcutt JK, Fletcher DL, Cox NA. Role of Dump Cage Fecal Contamination in the Transfer of Campylobacter to Carcasses of Previously Negative Broilers. The Journal of Applied Poultry Research. 2003;12(2):190-5.
134. Hansson I, Ederoth M, Andersson L, Vagsholm I, Olsson Engvall E. Transmission of Campylobacter spp. to chickens during transport to slaughter. J Appl Microbiol. 2005;99(5):1149-57.
135. Hue O, Allain V, Laisney MJ, Le Bouquin S, Lalande F, Petetin I, et al. Campylobacter contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with Salmonella contamination. Food microbiology. 2011;28(5):862-8.
136. Hunter SM, Berrang ME, Meinersmann RJ, Harrison MA. Genetic diversity of Campylobacter on broiler carcasses collected preevisceration and postchill in 17 U.S. poultry processing plants. J Food Prot. 2009;72(1):49-54.
137. Berrang ME, Buhr RJ, Cason JA, Dickens JA. Broiler carcass contamination with Campylobacter from feces during defeathering. J Food Prot. 2001;64(12):2063-6.
138. Berrang ME, Bailey JS, Altekruze SF, Patel B, Shaw WK, Jr., Meinersmann RJ, et al. Prevalence and numbers of Campylobacter on broiler carcasses collected at rehang and postchill in 20 U.S. processing plants. J Food Prot. 2007;70(7):1556-60.
139. Berrang ME, Meinersmann RJ, Smith DP, Zhuang H. The effect of chilling in cold air or ice water on the microbiological quality of broiler carcasses and the population of Campylobacter. Poult Sci. 2008;87(5):992-8.
140. Allos BM. Campylobacter jejuni Infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis. 2001;32(8):1201-6.
141. Aarestrup FM, Engberg J. Antimicrobial resistance of thermophilic Campylobacter. Veterinary research. 2001;32(3-4):311-21.
142. Elviss NC, Williams LK, Jorgensen F, Chisholm SA, Lawson AJ, Swift C, et al. Amoxicillin therapy of poultry flocks: effect upon the selection of amoxicillin-resistant commensal Campylobacter spp. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2009;64(4):702-11.

143. Griggs DJ, Peake L, Johnson MM, Ghori S, Mott A, Piddock LJ. Beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance in *Campylobacter* species: prevalence of Cj0299 (bla OXA-61) and evidence for a novel beta-Lactamase in *C. jejuni*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(8):3357-64.
144. Bolinger H, Kathariou S. The Current State of Macrolide Resistance in *Campylobacter* spp.: Trends and Impacts of Resistance Mechanisms. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(12).
145. Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP. Quinolone resistance in *campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1991;27(2):199-208.
146. Nelson JM, Chiller TM, Powers JH, Angulo FJ. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clin Infect Dis*. 2007;44(7):977-80.
147. Nachamkin I, Ung H, Li M. Increasing fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(12):1501-3.
148. Unicom LE, Ferguson J, Stafford RJ, Ashbolt R, Kirk MD, Becker NG, et al. Low-level fluoroquinolone resistance among *Campylobacter jejuni* isolates in Australia. *Clin Infect Dis*. 2006;42(10):1368-74.
149. Duarte A, Santos A, Manageiro V, Martins A, Fraqueza MJ, Canica M, et al. Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: high genetic diversity and antibiotic resistance rates. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(4):306-13.
150. Ma L, Wang Y, Shen J, Zhang Q, Wu C. Tracking *Campylobacter* contamination along a broiler chicken production chain from the farm level to retail in China. *Int J Food Microbiol*. 2014;181:77-84.
151. Li H, Wang Y, Fu Q, Wang Y, Li X, Wu C, et al. Integrated Genomic and Proteomic Analyses of High-level Chloramphenicol Resistance in *Campylobacter jejuni*. *Sci Rep*. 2017;7(1):16973.
152. McCrackin MA, Helke KL, Galloway AM, Poole AZ, Salgado CD, Marriott BP. Effect of Antimicrobial Use in Agricultural Animals on Drug-resistant Foodborne *Campylobacteriosis* in Humans: A Systematic Literature Review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2016;56(13):2115-32.
153. Tang Y, Fang L, Xu C, Zhang Q. Antibiotic resistance trends and mechanisms in the foodborne pathogen, *Campylobacter*. *Animal health research reviews*. 2017:1-12.
154. Luo N, Pereira S, Sahin O, Lin J, Huang S, Michel L, et al. Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(3):541-6.

155. Guo B, Lin J, Reynolds DL, Zhang Q. Contribution of the multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species. *Foodborne pathogens and disease*. 2010;7(1):77-83.
156. Yao H, Shen Z, Wang Y, Deng F, Liu D, Naren G, et al. Emergence of a Potent Multidrug Efflux Pump Variant That Enhances *Campylobacter* Resistance to Multiple Antibiotics. *mBio*. 2016;7(5).
157. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2001;65(2):232-60 ; second page, table of contents.
158. Lin J, Michel LO, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(7):2124-31.
159. Qin S, Wang Y, Zhang Q, Chen X, Shen Z, Deng F, et al. Identification of a novel genomic island conferring resistance to multiple aminoglycoside antibiotics in *Campylobacter coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(10):5332-9.
160. Lee MD, Sanchez S, Zimmer M, Idris U, Berrang ME, McDermott PF. Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(11):3660-4.
161. Yao H, Liu D, Wang Y, Zhang Q, Shen Z. High Prevalence and Predominance of the aph(2'')-I<sub>f</sub> Gene Conferring Aminoglycoside Resistance in *Campylobacter*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(5).
162. Tang Y, Dai L, Sahin O, Wu Z, Liu M, Zhang Q. Emergence of a plasmid-borne multidrug resistance gene cfr(C) in foodborne pathogen *Campylobacter*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(6):1581-8.
163. Long KS, Poehlsgaard J, Kehrenberg C, Schwarz S, Vester B. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(7):2500-5.
164. Frye JG, Lindsey RL, Meinersmann RJ, Berrang ME, Jackson CR, Englen MD, et al. Related antimicrobial resistance genes detected in different bacterial species co-isolated from swine fecal samples. *Foodborne pathogens and disease*. 2011;8(6):663-79.
165. Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2006;58(2):243-55.
166. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future microbiology*. 2009;4(2):189-200.
167. Wang Y, Zhang M, Deng F, Shen Z, Wu C, Zhang J, et al. Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(9):5405-12.

168. Qin S, Wang Y, Zhang Q, Zhang M, Deng F, Shen Z, et al. Report of ribosomal RNA methylase gene *erm*(B) in multidrug-resistant *Campylobacter coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(4):964-8.
169. Zhou J, Zhang M, Yang W, Fang Y, Wang G, Hou F. A seventeen-year observation of the antimicrobial susceptibility of clinical *Campylobacter jejuni* and the molecular mechanisms of erythromycin-resistant isolates in Beijing, China. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2016;42:28-33.
170. Florez-Cuadrado D, Ugarte-Ruiz M, Quesada A, Palomo G, Dominguez L, Porrero MC. Description of an *erm*(B)-carrying *Campylobacter coli* isolate in Europe. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(3):841-3.
171. Stanley J, Linton D, Burnens AP, Dewhirst FE, On SL, Porter A, et al. *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology*. 1994;140 ( Pt 12):3441-9.
172. Hassan AK, Shahata MA, Refaie EM, Ibrahim RS. Detection and Identification of *Helicobacter pullorum* in Poultry Species in Upper Egypt. *Journal of Advanced Veterinary Research*. 2014(1):42-8%V 4.
173. On SL, Holmes B, Sackin MJ. A probability matrix for the identification of campylobacters, helicobacters and allied taxa. *The Journal of applied bacteriology*. 1996;81(4):425-32.
174. Fox JG. The non-*H pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*. 2002;50(2):273-83.
175. Ceelen LM, Decostere A, Van den Bulck K, On SL, Baele M, Ducatelle R, et al. *Helicobacter pullorum* in chickens, Belgium. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(2):263-7.
176. Fox JG, Chien CC, Dewhirst FE, Paster BJ, Shen Z, Melito PL, et al. *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. *J Clin Microbiol*. 2000;38(7):2546-9.
177. Waldenstrom J, On SL, Ottvall R, Hasselquist D, Harrington CS, Olsen B. Avian reservoirs and zoonotic potential of the emerging human pathogen *Helicobacter canadensis*. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(12):7523-6.
178. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS microbiology reviews*. 2009;33(2):376-93.
179. Borges V, Santos A, Correia CB, Saraiva M, Menard A, Vieira L, et al. *Helicobacter pullorum* isolated from fresh chicken meat: antibiotic resistance and genomic traits of an emerging foodborne pathogen. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(23):8155-63.
180. Ceelen LM, Decostere A, Chiers K, Ducatelle R, Maes D, Haesebrouck F. Pathogenesis of *Helicobacter pullorum* infections in broilers. *Int J Food Microbiol*. 2007;116(2):207-13.



181. Burnens AP, Stanley J, Morgenstern R, Nicolet J. Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum*. *Lancet*. 1994;344(8936):1569-70.
182. Corry JE, Atabay HI. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Symposium series (Society for Applied Microbiology). 2001(30):96s-114s.
183. Ceelen L, Decostere A, Devriese LA, Ducatelle R, Haesebrouck F. In vitro susceptibility of *Helicobacter pullorum* strains to different antimicrobial agents. *Microb Drug Resist*. 2005;11(2):122-6.
184. Burnens AP, Stanley J, Nicolet J. Possible Association of *Helicobacter pullorum* with Lesions of Vibronic Hepatitis in Poultry. In: Newell DG, Ketley JM, Feldman RA, editors. *Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms*. Boston, MA: Springer US; 1996. p. 291-3.
185. Manfreda G, Parisi A, Lucchi A, Zaroni RG, De Cesare A. Prevalence of *Helicobacter pullorum* in conventional, organic, and free-range broilers and typing of isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(2):479-84.
186. Ahmed N, Dobrindt U, Hacker J, Hasnain SE. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(5):387-94.
187. Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, Obst U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS microbiology ecology*. 2003;43(3):325-35.
188. Oluyeye JO, Dada AC, Odeyemi AT. Incidence of multiple antibiotic resistant Gram-negative bacteria isolated from surface and underground water sources in south western region of Nigeria. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*. 2009;59(10):1929-36.
189. Soe Soe Wai AAS, Z. Zunita, L. Hassan and A. Jalila. Occurrence of Co-Infection of *Helicobacter pullorum* and *Campylobacter* spp. in Broiler and Village (Indigenous) Chickens. 2012-10-20;v. 32.
190. Jamshidi A, Bassami MR, Salami H, Mohammadi S. Isolation and identification of *Helicobacter pullorum* from caecal content of broiler chickens in Mashhad, Iran. *Iran J Vet Res*. 2014;15(2):179-82.
191. Waino M, Bang DD, Lund M, Nordentoft S, Andersen JS, Pedersen K, et al. Identification of campylobacteria isolated from Danish broilers by phenotypic tests and species-specific PCR assays. *J Appl Microbiol*. 2003;95(4):649-55.
192. Wedderkopp A, Rattenborg E, Madsen M. National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. *Avian Dis*. 2000;44(4):993-9.
193. Miller KA, Blackall LL, Mifflin JK, Templeton JM, Blackall PJ. Detection of *Helicobacter pullorum* in meat chickens in Australia. *Aust Vet J*. 2006;84(3):95-7.

194. Kaakoush NO, Sodhi N, Chenu JW, Cox JM, Riordan SM, Mitchell HM. The interplay between *Campylobacter* and *Helicobacter* species and other gastrointestinal microbiota of commercial broiler chickens. *Gut Pathog.* 2014;6:18.
195. Turk ML, Cacioppo LD, Ge Z, Shen Z, Whary MT, Parry N, et al. Persistent *Helicobacter pullorum* colonization in C57BL/6NTac mice: a new mouse model for an emerging zoonosis. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 5):720-8.
196. Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Cutufia MA, Turrini F, Grigioni WF, et al. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemaker? *Med Hypotheses.* 2000;54(2):275-7.
197. Ananieva O, Nilsson I, Vorobjova T, Uibo R, Wadstrom T. Immune responses to bile-tolerant *Helicobacter* species in patients with chronic liver diseases, a randomized population group, and healthy blood donors. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(6):1160-4.
198. Karagin PH, Stenram U, Wadstrom T, Ljungh A. *Helicobacter* species and common gut bacterial DNA in gallbladder with cholecystitis. *World J Gastroenterol.* 2010;16(38):4817-22.
199. Rocha M, Avenaud P, Menard A, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P, et al. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2005;54(3):396-401.
200. Pellicano R, Menard A, Rizzetto M, Megraud F. *Helicobacter* species and liver diseases: association or causation? *The Lancet Infectious diseases.* 2008;8(4):254-60.
201. Casswall TH, Nemeth A, Nilsson I, Wadstrom T, Nilsson HO. *Helicobacter* species DNA in liver and gastric tissues in children and adolescents with chronic liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 2010;45(2):160-7.
202. Fox JG, Dewhirst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, et al. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology.* 1998;114(4):755-63.
203. Bohr UR, Glasbrenner B, Primus A, Zagoura A, Wex T, Malfertheiner P. Identification of enterohepatic *Helicobacter* species in patients suffering from inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol.* 2004;42(6):2766-8.
204. Veijola L, Nilsson I, Halme L, Al-Soud WA, Makinen J, Ljungh A, et al. Detection of *Helicobacter* species in chronic liver disease and chronic inflammatory bowel disease. *Ann Med.* 2007;39(7):554-60.
205. Tee W, Montgomery J, Dyal-Smith M. Bacteremia caused by a *Helicobacter pullorum*-like organism. *Clin Infect Dis.* 2001;33(10):1789-91.
206. Shahram Behro, Afshin Javadi, Rad MG. HELICOBACTER PULLORUM PREVALENCE IN PATIENTS WITH GASTROENTERITIS IN HUMANS AND CHICKEN IN THE PROVINCE OF

ARDABIL IN 2014. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 2015;Vol. 5 (2):pp.87-94.

207. Young VB, Chien CC, Knox KA, Taylor NS, Schauer DB, Fox JG. Cytolethal distending toxin in avian and human isolates of *Helicobacter pullorum*. J Infect Dis. 2000;182(2):620-3.
208. Fukuda K, Kuroki T, Tajima Y, Tsuneoka N, Kitajima T, Matsuzaki S, et al. Comparative analysis of *Helicobacter* DNAs and biliary pathology in patients with and without hepatobiliary cancer. Carcinogenesis. 2002;23(11):1927-31.
209. Murata H, Tsuji S, Tsujii M, Fu HY, Tanimura H, Tsujimoto M, et al. *Helicobacter bilis* infection in biliary tract cancer. Aliment Pharmacol Ther. 2004;20 Suppl 1:90-4.
210. Figura N, Franceschi F, Santucci A, Bernardini G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter. 2010;15 Suppl 1:60-8.
211. Chen DF, Hu L, Yi P, Liu WW, Fang DC, Cao H. H pylori are associated with chronic cholecystitis. World J Gastroenterol. 2007;13(7):1119-22.
212. Laharie D, Asencio C, Asselineau J, Bulois P, Bourreille A, Moreau J, et al. Association between entero-hepatic *Helicobacter* species and Crohn's disease: a prospective cross-sectional study. Aliment Pharmacol Ther. 2009;30(3):283-93.
213. Hynes SO, Ferris JA, Szponar B, Wadstrom T, Fox JG, O'Rourke J, et al. Comparative chemical and biological characterization of the lipopolysaccharides of gastric and enterohepatic helicobacters. Helicobacter. 2004;9(4):313-23.
214. Varon C, Duriez A, Lehours P, Menard A, Laye S, Zerbib F, et al. Study of *Helicobacter pullorum* proinflammatory properties on human epithelial cells in vitro. Gut. 2009;58(5):629-35.
215. Sirianni A, Kaakoush NO, Raftery MJ, Mitchell HM. The pathogenic potential of *Helicobacter pullorum*: possible role for the type VI secretion system. Helicobacter. 2013;18(2):102-11.
216. Bauer S, Endres M, Lange M, Schmidt T, Schumbrutzki C, Sickmann A, et al. Novel function assignment to a member of the essential HP1043 response regulator family of epsilon-proteobacteria. Microbiology. 2013;159(Pt 5):880-9.
217. Bras AM, Chatterjee S, Wren BW, Newell DG, Ketley JM. A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization. J Bacteriol. 1999;181(10):3298-302.
218. Blanco P, Hernando-Amado S, Reales-Calderon JA, Corona F, Lira F, Alcalde-Rico M, et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. Microorganisms. 2016;4(1).
219. Azevedo NF, Almeida C, Fernandes I, Cerqueira L, Dias S, Keevil CW, et al. Survival of gastric and enterohepatic *Helicobacter* spp. in water: implications for transmission. Appl Environ Microbiol. 2008;74(6):1805-11.

220. Yanagisawa N, Geirons L, Al-Soud WA, Ljungh S. Expression of matrix metalloprotease-2, -7 and -9 on human colon, liver and bile duct cell lines by enteric and gastric *Helicobacter* species. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(2):197-204.
221. Parente MR, Monteiro JT, Martins GG, Saraiva LM. *Helicobacter pullorum* induces nitric oxide release in murine macrophages that promotes phagocytosis and killing. *Microbiology*. 2016;162(3):503-12.
222. Kornilovs'ka I, Nilsson I, Utt M, Ljungh A, Wadstrom T. Immunogenic proteins of *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter bilis* and *Helicobacter hepaticus* identified by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *Proteomics*. 2002;2(6):775-83.
223. Sanyal SC, Islam KM, Neogy PK, Islam M, Speelman P, Huq MI. *Campylobacter jejuni* diarrhea model in infant chickens. *Infection and immunity*. 1984;43(3):931-6.
224. Clyne M, Drumm B. Adherence of *Helicobacter pylori* to primary human gastrointestinal cells. *Infection and immunity*. 1993;61(10):4051-7.
225. Ruiz-Palacios GM, Escamilla E, Torres N. Experimental *Campylobacter* diarrhea in chickens. *Infection and immunity*. 1981;34(1):250-5.
226. Ceelen LM, Haesebrouck F, Favoreel H, Ducatelle R, Decostere A. The cytolethal distending toxin among *Helicobacter pullorum* strains from human and poultry origin. *Vet Microbiol*. 2006;113(1-2):45-53.
227. Jinadasa RN, Bloom SE, Weiss RS, Duhamel GE. Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology*. 2011;157(Pt 7):1851-75.
228. Varon C, Mocan I, Mihi B, Pere-Vedrenne C, Aboubacar A, Morate C, et al. *Helicobacter pullorum* cytolethal distending toxin targets vinculin and cortactin and triggers formation of lamellipodia in intestinal epithelial cells. *J Infect Dis*. 2014;209(4):588-99.
229. Guidi R, Guerra L, Levi L, Stenerlow B, Fox JG, Josenhans C, et al. Chronic exposure to the cytolethal distending toxins of Gram-negative bacteria promotes genomic instability and altered DNA damage response. *Cellular microbiology*. 2013;15(1):98-113.
230. Ceelen LM, Haesebrouck F, D'Herde K, Krysko DV, Favoreel H, Vandenabeele P, et al. Mitotic catastrophe as a prestage to necrosis in mouse liver cells treated with *Helicobacter pullorum* sonicates. *J Morphol*. 2009;270(8):921-8.
231. Ando ES, De-Gennaro LA, Faveri M, Feres M, DiRienzo JM, Mayer MP. Immune response to cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients. *Journal of periodontal research*. 2010;45(4):471-80.
232. Memon AA, Hussein NR, Miendje Deyi VY, Burette A, Atherton JC. Vacuolating cytotoxin genotypes are strong markers of gastric cancer and duodenal ulcer-associated *Helicobacter pylori* strains: a matched case-control study. *J Clin Microbiol*. 2014;52(8):2984-9.

233. Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current opinion in microbiology*. 2008;11(1):3-8.
234. Hachani A, Lossi NS, Filloux A. A visual assay to monitor T6SS-mediated bacterial competition. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(73):e50103.
235. Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. *Cell host & microbe*. 2014;15(1):9-21.
236. Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(39):15508-13.
237. Bleumink-Pluym NM, van Alphen LB, Bouwman LI, Wosten MM, van Putten JP. Identification of a functional type VI secretion system in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity. *PLoS pathogens*. 2013;9(5):e1003393.
238. Miyata ST, Bachmann V, Pukatzki S. Type VI secretion system regulation as a consequence of evolutionary pressure. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 5):663-76.
239. Alteri CJ, Himpsl SD, Pickens SR, Lindner JR, Zora JS, Miller JE, et al. Multicellular bacteria deploy the type VI secretion system to preemptively strike neighboring cells. *PLoS pathogens*. 2013;9(9):e1003608.
240. Mateos-Munoz B, Perez-de-la-Serna J, Ruiz-de-Leon A, Serrano-Falcon B, Casabona-Frances S, Velasco-Cerrudo A, et al. Enterohepatic *Helicobacter* other than *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig*. 2013;105(8):477-84.
241. Melito PL, Woodward DL, Bernard KA, Price L, Khakhria R, Johnson WM, et al. Differentiation of clinical *Helicobacter pullorum* isolates from related *Helicobacter* and *Campylobacter* species. *Helicobacter*. 2000;5(3):142-7.
242. Hassan AK, Shahata MA, Refaie EM, Ibrahim RS. Pathogenicity testing and antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pullorum* isolates from chicken origin. *Int J of Vet Sci Med*. 2014.
243. Shen Z, Sheh A, Young SK, Abouelliel A, Ward DV, Earl AM, et al. Draft genome sequences of six enterohepatic *helicobacter* species isolated from humans and one from rhesus macaques. *Genome Announc*. 2014;2(5).
244. Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current opinion in microbiology*. 2003;6(5):452-6.
245. Roe MT, Pillai SD. Monitoring and identifying antibiotic resistance mechanisms in bacteria. *Poult Sci*. 2003;82(4):622-6.
246. Cantas L, Shah SQ, Cavaco LM, Manaia CM, Walsh F, Popowska M, et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiol*. 2013;4:96.

247. Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, Kumeda Y, et al. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 11):1467-73.
248. Meinersmann RJ, Helsel LO, Fields PI, Hiett KL. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *J Clin Microbiol*. 1997;35(11):2810-4.
249. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular biology and evolution*. 2016;33(7):1870-4.
250. Abdul-Aziz; T, Fletcher; OJ, Barnes HJ. *Avian Histopathology*. The American Association of Avian Pathologists. 2016;4th Edition.